



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública**

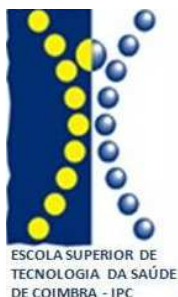


# **INFLUÊNCIA DO SORO DE DOENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO NA ACTIVAÇÃO *IN VITRO* DE MONÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS**

**DIANE MENDES GOMES**

**Coimbra**

**2013**



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública**



## **INFLUÊNCIA DO SORO DE DOENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO NA ACTIVAÇÃO *IN VITRO* DE MONÓCITOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Professor Adjunto na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e coorientação da Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública Ana Maria de Figueiredo Valado, Professora Adjunta na Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

## **Agradecimentos**

### **Agradeço:**

À Dr.<sup>a</sup> Maria Luísa Pais, ex. directora do antigo Centro de Histocompatibilidade do Centro, pela oportunidade de realizar os estudos laboratoriais inerentes a esta tese.

Ao Professor Doutor Artur Paiva, pela orientação no decorrer da tese e por todos os ensinamentos de Imunologia, Hematologia e Citometria de Fluxo durante a Licenciatura e Mestrado, e por estar sempre disponível a acolher novos projectos de investigação.

A todos os profissionais do Laboratório de Citometria de Fluxo e Laboratório de Genómica do Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra, pelo acolhimento, simpatia e integração na equipa; de uma forma directa à Susana Pedreiro, Ana Paula Lopes, Dr. António Martinho e de forma especial ao Tiago Carvalheiro pela amizade, profissionalismo, disponibilidade e incessável ajuda e confiança no decorrer de toda a tese.

À equipa do Serviço de Reumatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – Hospitais da Universidade de Coimbra, ao Professor Doutor José António Pereira da Silva e Dr. Luís Inês pela colaboração na obtenção de todas as amostras dos doentes, usadas no estudo.

Ao Professor Howard Young, do Laboratório de Imunologia Experimental do Centro de Pesquisa do Cancro, Instituto Nacional do Cancro, Frederick - EUA, pela cedência dos resultados do TNF- $\alpha$  sérico.

À minha co-orientadora Professora Ana Valado, por todos os ensinamentos e ajuda nos processos burocráticos no decorrer da tese.

A todos os doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico que, embora no anonimato, prestaram uma contribuição fundamental para que este estudo fosse possível e para o avanço da investigação científica.

A todos os meus colegas de trabalho do Laboratório Alves & Duarte – Euromedic Alcobça, por serem realmente uma equipa especial, pela amizade, preocupação, apoio e disponibilidade.

A todos os meus amigos e colegas, de modo especial à Patrícia Ferreira pela amizade e hospitalidade.

A todos os meus familiares, em especial ao meu irmão Nelson e sobrinha Petra e com especial carinho aos meus pais Albino e Laurinda, pelo apoio, amor e carinho incondicionais em todos os momentos.

Ao Eurico, pela força e motivação nos momentos de maior ansiedade, pela paciência, por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado.

## **Júri**

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública

António José dos Santos Gabriel

Professor Adjunto da ESTeSC

Doutora Maria Margarida Souto Carneiro

Investigadora Auxiliar do Centro de Neurociências e Biologia Celular  
da Universidade de Coimbra

Doutor Artur Augusto Paiva

Professor Adjunto da ESTeSC

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública

Ana Maria de Figueiredo Valado

Professora Adjunta da ESTeSC

## Resumo

**Introdução:** O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença auto-imune caracterizada por uma desregulação do sistema imune, que leva a uma produção aumentada de anticorpos e formação de imuno-complexos, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e dano celular de diferentes órgãos.

**Objectivos:** Este trabalho teve como objectivos a avaliação do efeito estimulatório provocado pelo soro de doentes com LES em monócitos e células dendríticas (DCs) do sangue periférico de controlos saudáveis e a quantificação de TNF- $\alpha$  no soro de doentes com LES e de um grupo controlo.

**Material e Métodos:** Foram incluídos neste estudo 21 doentes com LES, agrupados de acordo com o índice de actividade da doença, em doentes com doença activa (LESA) - 11 e inactiva (LESI) - 11, bem como 10 indivíduos saudáveis que constituíram o grupo controlo. A expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> obtidas do sangue periférico de indivíduos saudáveis foi avaliada por citometria de fluxo, após estimulação *in vitro* com LPS e na presença de soro de doentes com LES e de um grupo controlo. O estudo da expressão génica de TNF- $\alpha$  foi realizado após separação das diferentes populações celulares em estudo por qRT-PCR. A concentração sérica de TNF- $\alpha$  foi determinada em 64 doentes com LES e 27 controlos, quantificada através da MILLIPLEX MAP Human TH17 Magnetic Bead Panel Premixed.

**Resultados:** Observou-se que o soro de doentes com LES, particularmente aqueles com um maior título de ac. anti-dsDNA, provocava um aumento da expressão de TNF- $\alpha$ , nos monócitos e principalmente nas DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>. Também se observou um aumento da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  nesta última população celular, bem como um aumento da concentração sérica de TNF- $\alpha$  nos doentes com LES.

**Conclusão:** Este estudo enfatiza o papel do ambiente inflamatório a nível periférico nos doentes com LES e a sua importância na activação das células circulantes

## Palavras-chave

Lupus Eritematoso Sistémico, Soro, Monócitos, Células Dendríticas, TNF- $\alpha$ , IL-6

## Abstract

**Introduction:** Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by dysregulation of the immune system which leads to an increased production of antibodies and formation of immune complexes, resulting in production of pro-inflammatory cytokines and cell damage in different organs.

**Aims:** The aim of this study was evaluate the stimulatory effect induced by sera from SLE patients in monocytes and dendritic cells (DCs) from healthy individuals and quantify of soluble TNF-  $\alpha$  in sera from SLE patients and in a control group.

**Material and Methods:** In this study were enrolled 21 SLE patients, classified according to the index of disease activity in patients with active disease (ASLE) - 11, and patients with inactive disease (ISLE) – 11, as well as 10 healthy individuals as a group control. The expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in monocytes, mDCs and CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> DCs obtained from peripheral blood of healthy individuals was analysed, after in vitro stimulation with LPS in the presence of SLE patients serum, by flow cytometry. The TNF- $\alpha$  gene expression was performed after cell sorting by qRT-PCR. Soluble TNF- $\alpha$  was determined in 64 SLE patients and 27 healthy control by MILLIPLEX MAP Human TH17 Magnetic Bead Panel Premixed.

**Results:** It was observed a higher TNF- $\alpha$  expression in monocytes but particularly in CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> DCs, when stimulated in the presence of SLE patients serum, particularly in those with high levels of anti-dsDNA. We also observed an increase mRNA expression of TNF- $\alpha$  in CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> DCs, as well as a higher soluble TNF- $\alpha$  in the sera from SLE patients.

**Conclusion:** This study emphasizes the role of the inflammatory environment at the peripheral level in SLE patients and its importance in the activation of circulating cells.

## Keywords

Systemic Lupus Erythematosus, Serum, Monocytes, Dendritic cells, TNF- $\alpha$ , IL-6

## I – Índice

1. Introdução .....	1
1.1 O Lupus Eritematoso Sistémico (LES) .....	1
1.2 As células apresentadoras de antígeno e o seu contexto no LES .....	4
1.3 A relação entre os imuno-complexos (IC) do soro de doentes com LES e produção de citocinas pró-inflamatórias .....	7
1.4 Características do soro de doentes com LES .....	9
2. Objectivos .....	11
2.1 Objectivos específicos .....	11
3. Material e Métodos .....	12
3.1 População em estudo .....	12
3.1.1 Doentes .....	12
3.1.2 Grupo Controlo .....	15
3.2 Amostras .....	15
3.3 Ética .....	15
3.4 Estimulação <i>in vitro</i> de monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-/low</sup> com soro de doentes com LES .....	16
3.5 Avaliação da expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ pelos monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-/low</sup> , por citometria de fluxo .....	16
3.6 Avaliação da expressão da IgG ligada nos monócitos, mDCs, pDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-/low</sup> , por citometria de fluxo .....	17
3.7 Aquisição no citómetro de fluxo e análise .....	18
3.8 Análise da expressão génica relativa após separação celular de monócitos, mDCs, DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-/low</sup> e Células T .....	18
3.9 Determinação da concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LES .....	20
3.10 Tratamento estatístico .....	20
4. Resultados .....	21
4.1 Frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-/low</sup> produtores das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6, bem como, a expressão das citocinas por célula, após estimulação <i>in vitro</i> com LPS e com contacto com o soro de doentes com LES .....	21
4.1.1 Relação com a quantidade de anticorpos anti-dsDNA e o efeito produzido pelos soros dos doentes com LES .....	26
4.1.2 Relação com os parâmetros clínicos dos doentes e o efeito produzido pelos soros dos doentes com LES .....	27
4.2 Expressão génica relativa de TNF- $\alpha$ em monócitos, mDCs, DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-/low</sup> e células T do sangue periférico, obtidos por separação celular, após estimulação com soro de doentes com LES .....	30
4.3 Concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LES .....	31
4.3.2 Relação com os parâmetros clínicos dos doentes com LES .....	32
4.3.3 Relação com a terapêutica dos doentes com LES .....	33
5. Discussão .....	34
6. Conclusão .....	39
7. Bibliografia .....	40

## II - Listas de Figuras e Gráficos

<b>Figura 1</b> – Diagrama dos sucessivos eventos para a patogénese do LES.....	4
<b>Figura 2</b> – Esquema indicando uma possível fonte e efeito do IFN- $\alpha$ no LES.....	8
<b>Figura 3</b> - Estratégia para isolar monócitos, e as diferentes populações de DCs por citometria de fluxo e representação da expressão de IgG pelas diferentes células. ....	23
<b>Gráfico 1</b> – Expressão de TNF- $\alpha$ (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-low</sup> de indivíduos saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente com soro LESA , LESI e soro controlo.....	25
<b>Gráfico 2</b> – Expressão de IL-6 (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente soro LESA , LESI e soro controlo.....	25
<b>Gráfico 3</b> – Expressão de TNF- $\alpha$ (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto, respectivamente, soro de doentes com LES com diferentes títulos de Ac. Anti-dsDNA e soro controlo.....	26
<b>Gráfico 4</b> – Expressão de IL-6 (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente soro de doentes com LES com diferentes títulos de Ac. Anti-dsDNA e soro controlo. ....	27
<b>Gráfico 5</b> – Expressão de TNF- $\alpha$ (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente com soro de doentes com LES com diferente envolvimento cutâneo e soro controlo.....	28
<b>Gráfico 6</b> – Expressão de TNF- $\alpha$ (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente com soro de doentes com LES com diferentes estádios de nefrite lúpica e soro controlo.....	29
<b>Gráfico 7</b> – Estudo da expressão génica de TNF- $\alpha$ nas DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-low</sup> , após contacto <i>in vitro</i> com os diferentes soros. ....	30
<b>Gráfico 8</b> – Concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LESA, LESI e grupo controlo.	31
<b>Gráfico 9</b> – Concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LES com diferentes títulos de Ac. Anti-dsDNA e soro controlo.....	32
<b>Gráfico 10</b> – Concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LES com diferentes estádios de nefrite lúpica e soro controlo. ....	32
<b>Gráfico 11</b> – Estudo da concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LES com diferentes doses terapêuticas de a) imunossuppressores , b) hidroxicloraquina ou c) esteróides. ....	33



### III - Listas de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Descrição e frequência dos critérios clínicos previstos pelo <i>American College of Rheumatology</i> 1997, para diagnóstico do Lupus Eritematoso Sistêmico.....	2
<b>Tabela 2</b> - Características clínicas dos 22 doentes com LES, utilizados para o estudo funcional das células na presença do soro. ....	13
<b>Tabela 3</b> - Características clínicas dos 64 doentes com LES, utilizados para determinar a concentração sérica de TNF- $\alpha$ . ....	14
<b>Tabela 4</b> - Frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>~low</sup> produtores de TNF- $\alpha$ e IL-6 após estimulação com LPS e respectivamente soros de LESA, LESI e de um grupo controlo. ....	24

## IV – Listas de Abreviaturas

ACR - *American College of Rheumatology* (Colégio Americano de Reumatologia)

Ac. anti-dsDNA - Anticorpos anti-cadeia dupla de ADN

ANA - Anticorpos anti-nucleares

APC - *Antigen presenting cell* (célula apresentadora de antígeno)

CD - Cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)

DC - Célula dendrítica

Fc - Fração constante

FcγR - Receptor para fração constante das imunoglobulinas

HLA - *Human leucocyte antigen* (antígeno leucocitário Humano)

IC - Imuno-complexos

ICAM - Molécula de adesão celular

IFN - Interferão

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

LES - Lúpus Eritematoso Sistémico

LPS - Lipopolissacarídeo

mDC - Célula dendrítica mielóide

MIF - Média de intensidade de fluorescência

pDC - Célula dendrítica plasmacitóide

PRR - *Pattern recognition receptor* (Receptor reconhecedor de padrões moleculares)

SLEDAI - *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (Índice de actividade de doença em Lúpus Eritematoso Sistémico)

TLR - *Toll like receptor* (receptor tipo toll)

TNF - *Tumor Necrosis Factor* (Factor de Necrose Tumoral)

# **1. Introdução**

## **1.1 O Lupus Eritematoso Sistémico (LES)**

O Lupus Eritematoso Sistémico (LES) é considerado o protótipo das doenças auto-imunes, tendo o potencial de envolver directamente múltiplos tecidos e órgãos, como a pele, articulações, rins, coração e cérebro e apresentando diversas manifestações clínicas. Por exemplo, alguns doentes demonstram principalmente erupções cutâneas e dor articular, apresentando remissões espontâneas e requerendo baixa dose de medicação; enquanto o outro lado do espectro inclui doentes que demonstram um severo e progressivo envolvimento renal (glomerulonefrite), ou neurológico, que requer elevadas doses de esteróides e drogas citotóxicas como a ciclofosfamida.(1,2) A grande heterogeneidade do LES fomenta o debate de ser uma única doença com vários fenótipos, ou fenótipos semelhantes partilhados por diferentes doenças com diversos mecanismos patológicos.(3)

Factores sociodemográficos como o sexo, raça e etnia desempenham um importante papel na incidência da doença, frequência das manifestações e resposta terapêutica.(4) Apesar do LES poder ocorrer praticamente em qualquer idade, as mulheres em idade fértil são as mais afectadas. A razão feminina/masculina é superior a 8:1 para doentes com idades compreendidas entre os 15 e os 50 anos, enquanto a mesma razão para a doença desenvolvida na infância ou na pós-menopausa é perto de 2:1.(1)

Para fins de investigação e identificação clínica dos doentes com LES, a maioria dos reumatologistas concorda com o critério *American College of Rheumatology* 1982 (ACR), revisto em 1997. O critério inclui um conjunto de características clínicas e laboratoriais que estão descritas com a sua respectiva prevalência no LES na Tabela 1. Um doente tem de ter quatro ou mais dos critérios descritos para ser classificado como um doente com LES. É de salientar que este critério de classificação não é um critério de diagnóstico, foi apenas desenvolvido, como referido anteriormente, para fins de investigação de modo a fornecer uma tentativa de padronização. Os critérios não necessitam de estar presentes em simultâneo, mas podem acumular-se ao longo dos anos. Deste modo, o critério de classificação consegue guiar para uma avaliação inicial do doente com LES, mas não é suficiente. Os doentes requerem uma avaliação sistemática, que pode ser guiada pelos componentes dos índices da actividade da doença do LES, como

por exemplo o *Systemic lupus erythematosus disease activity index 1992* (SLEDAI), revisto em 2000. Estes índices surgem como uma ferramenta válida e sensível para medir a actividade da doença, diferenciar entre um estágio de LES inactivo e LES activo, e para uso na rotina da prática clínica como guia de decisões terapêuticas.(2,5–7)

**Tabela 1** - Descrição e frequência dos critérios clínicos previstos pelo American College of Rheumatology 1997, para diagnóstico do Lupus Eritematoso Sistémico.(2)

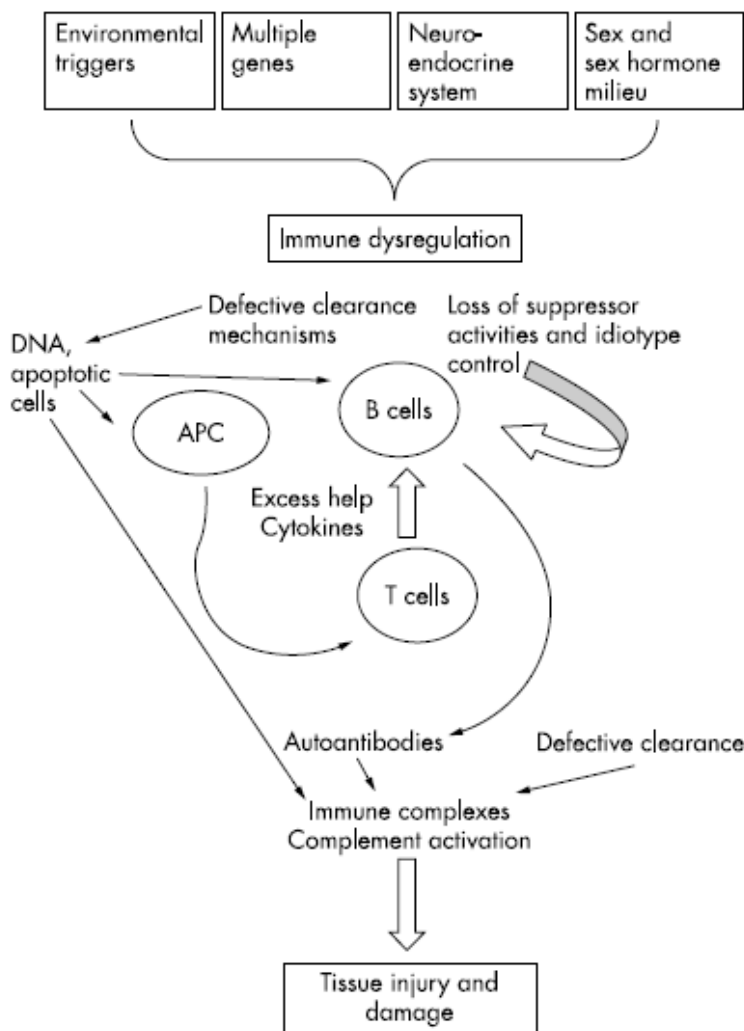
Manifestações	Prevalência em doentes com LES
<b><i>Critérios Clínicos ACR</i></b>	
- Exantema tipo borboleta	80-90%
- Exantema tipo discóide	
- Fotossensibilidade	
- Úlceras orais	50-70%
- Artrite	76-100%
- Serosite	30%
- Doença renal	50%
- Doença cerebral	
- Apoplexia	15%
- Psicose	20%
<b><i>Critérios Laboratoriais ACR</i></b>	
<b>Critérios Hematológicos</b>	
- Anemia hemolítica	5-40%
- Leucopenia	60%
- Linfopenia	60-84%
- Trombocitopenia	60%
<b>Critérios Imunológicos</b>	
- Anti-dsDNA	40-70%
- Anti-Smith	15-55%
- Anti-Fosfolípido	25-50%
<b>Anticorpos Anti-nucleares (ANA)</b>	
<b><i>Marcadores laboratoriais que não fazem parte do critério</i></b>	
- Anemia da doença crónica (Hct <35%)	57-78%
- Neutropenia	
- Anti-RNP	30-80%
- Anti-SSA/Ro	35-60%
- Anti-SSB/La	10-15%

A etiologia e fisiopatologia do LES continua elusiva, sendo a doença o resultado de uma cascata de eventos, induzidos por factores hormonais e ambientais, que surge num *background* genético predisponível.(8,9) O denominador comum entre os doentes com LES é a produção de anticorpos do tipo imunoglobulina G (IgG), e é característico da doença níveis séricos elevados de constituintes nucleares, incluindo anticorpos anti-nucleares (ANA), anti-cadeia dupla de DNA (dsDNA) e anti-Smith.(1,10,11)

Em indivíduos saudáveis, o sistema imune defende-se contra agentes agressores, distinguindo o próprio do não-próprio. Por razões não totalmente compreendidas, a tolerância imune é quebrada no LES e o sistema imune responde activamente a um conjunto amplo de auto-antígenos. A activação imuno-celular resultante leva à produção de anticorpos, imuno-complexos (IC) e citocinas inflamatórias, que estabelece um ciclo vicioso de inflamação crónica e destruição de tecidos. A apoptose celular aumentada e/ou diminuição da *clearance* de células mortas pode explicar a acumulação de auto-antígenos nucleares em vários tecidos de doentes com LES.(1,10,12–14) Concomitantemente, os níveis de complemento são anormais nos doentes com LES e componentes do complemento aparecem depositados em lesões inflamatórias nos tecidos. Estes achados laboratoriais levam a um modelo para a patogénese do LES onde os anticorpos formam IC com os seus antígenos, activando o complemento e a produção de citocinas inflamatórias causando danos tecidulares e doença.(15,16)

## 1.2 As células apresentadoras de antígeno e o seu contexto no LES

Estudos iniciais focaram-se no sistema imune adaptativo, tendo como base da doença as alterações funcionais de linfócitos B e T. Este paradigma foi refutado com recentes avanços no campo da imunidade inata. É actualmente reconhecido que o sistema imune inato, que normalmente tem como função a detecção da invasão de agentes patogénicos, tem um importante papel no reconhecimento de antígenos do próprio no LES.(17) Deste modo, a função anormal de linfócitos B e T resulta da subjacente função alterada das células apresentadoras de antígeno (APCs).(Figura 1)



**Figura 1** – Diagrama dos sucessivos eventos para a patogénese do LES.(9)

Dentro das APCs, os monócitos/macrófagos são um componente chave do sistema imune inato envolvido na regulação do sistema imune adaptativo, são células versáteis, capazes de defender, regular inflamação e induzir imunidade. Para além disso, os monócitos circulantes são recrutados para os locais de inflamação onde são activados e se diferenciam em macrófagos tecidulares especializados na fagocitose e subsequente apresentação antigénica.(18,19) Os monócitos reconhecem e removem agentes patogénicos, bem como células do hospedeiro, senescentes, degradadas ou mortas. A fagocitose é um processo regulado que requer a activação de receptores, que por seu turno transmitem sinais para o interior da célula para iniciar a resposta. Após digestão do alvo, os monócitos apresentam os antígenos a células T, induzindo-os a uma diferenciação linfócito T efector ou linfócito T auxiliar. Adicionalmente, os monócitos possuem uma função secretora bem desenvolvida e são uma importante fonte de uma variedade de citocinas.(20) O reconhecimento das moléculas do próprio e das moléculas não-próprias depende, em grande parte, dos receptores reconhecedores de padrões moleculares (PRR), entre os que são expressos pelos monócitos e que estão envolvidos na fagocitose encontram-se os receptores de manose, lectina e receptores *scavenger*. Expressam ainda receptores para as fracções constantes das imunoglobulinas (FcRs), importantes na endocitose de antígenos opsonizados e de complexos imunitários, que incluem receptores específicos para IgG monoméricas (FcγRI – CD64) ou em complexos (FcγRII ou FcγRIII – CD32 ou CD16) ou para IgE (CD23). Os monócitos expressam ainda receptores capazes de reconhecer elementos do sistema do complemento como o CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18). O CD14 é responsável pelo reconhecimento de lipopolissacarídeo (LPS) presentes na parede das bactérias Gram negativas sendo um dos principais marcadores fenotípicos destas células. Os monócitos e macrófagos produzem algumas moléculas de forma mais ou menos constitutiva enquanto outras, como a IL-1α e β, a IL-6, o factor de necrose tumoral alfa (TNF-α), as interferões alfa e beta (IFN-α e β), e factores de crescimento, são produzidas em situações de inflamação, sobretudo em resposta ao LPS e a citocinas produzidas por outras células. (21–24)

Diversos estudos focam anormalidades nos monócitos de doentes com LES, estando documentado uma actividade funcional reduzida com decréscimo de monócitos com antígenos dos leucócitos humanos DR<sup>+</sup> (HLA-DR<sup>+</sup>), aumento de CD14 solúvel (sCD14), aumento da expressão de CD54 (molécula de adesão celular I (ICAM-I)) e CD64

(FcγRI) e diminuição da expressão de CD32 (FcγRII). Os monócitos derivados de macrófagos de doentes com LES mostram assim uma fagocitose de corpos apoptóticos comprometida. Está descrito ainda que os monócitos de doentes com LES secretam significativamente mais TNF-α do que monócitos de dadores saudáveis,(25–27) e são menos afectados pelo efeito imunossupressor da IL-10 na presença de IC.(8,28,29)

As células dendríticas (DCs) são o elo entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. São APCs profissionais, especializadas na captura, processamento e apresentação de antígenos a células T, sendo potentes imunogénicos em condições inflamatórias, e essenciais na indução e manutenção da tolerância imune. Neste sentido, estudos emergentes sugerem que a heterogeneidade das DCs e os seus estádios de activação estão envolvidos na resposta auto-imune. Diversos estudos indicam que os monócitos se diferenciam em DCs *in vivo*.(30,31) No entanto, a diferenciação de DCs a partir de precursores pré-monócitos ou monócitos permanece controversa. Presentemente, está bem estabelecido que as DCs não são uma população celular homogénea, e pelo menos três diferentes subpopulações foram descritas em sangue periférico humano de indivíduos saudáveis. A subpopulação das DCs mieloides (mDCs) apresenta CD123<sup>dim</sup>/CD16<sup>-</sup>, expressa fortemente HLA-DR e antígenos mieloides CD11c e CD33. Esta subpopulação pode ser ainda dividida de acordo com a expressão de BDCA1 (CD1c<sup>+</sup>)DCs e BDCA3 (CD141<sup>+</sup>)DCs. Outra subpopulação, as DCs plasmacitóides (pDC) apresentam CD33<sup>-dim</sup>/CD16<sup>-</sup>, expressando níveis elevados de HLA-DR e CD123, BDCA2 e BDCA4. A terceira subpopulação apresenta CD14<sup>-/low</sup>/CD123<sup>inter</sup>/CD33<sup>inter</sup>/CD16<sup>+</sup> (CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup>). Esta última subpopulação foi previamente identificada como células mononucleares e considerada como uma subpopulação menor de monócitos, apresentando uma expressão elevada de FcγRIII (CD16), fraca expressão de FcγRI (CD64), baixos níveis de FcγRII (CD32), relativamente baixa actividade como APCs relativamente a outras DCs do sangue periférico e uma elevada capacidade para induzir activação de células T *naive*, *in vitro*. Mais tarde, foi identificada especificamente usando um anticorpo monoclonal M-DC8, no entanto a sua origem permanece controversa.(18,32–36) Estudos revelam que as DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup>, embora apresentem uma pronunciada actividade oxidativa e fagocítica, expressam fracamente mieloperoxidase, α-naftil acetato esterase e lisozima, que estão envolvidas no processamento de partículas fagocitadas nos monócitos;



podendo-se especular que as DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> usam diferentes vias de processamento de partículas internalizadas, embora ainda não completamente esclarecido.(32)

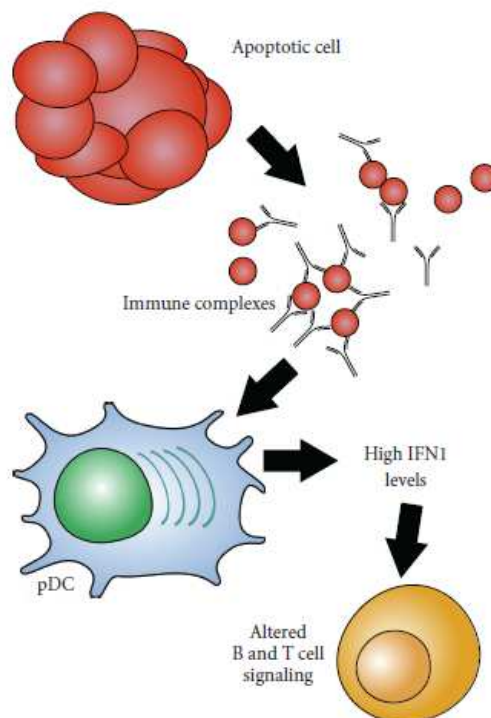
À semelhança dos monócitos, existem diversos estudos sobre as DCs no contexto do LES, descrevendo alterações no número de DCs no sangue periférico, nomeadamente nas subpopulações mDCs e CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>, na sua capacidade de produzir citocinas inflamatórias, estágio de activação e expressão de receptores de quimiocinas. (18,37–39) Uma característica importante das mDCs no contexto do LES é a sua capacidade para internalizar material apoptótico e necrótico e apresentá-lo às células T. Em contraste com as mDCs, as pDCs internalizam estes complexos, produzindo elevadas quantidades de IFN do tipo I (principalmente IFN- $\alpha$ ). (40)

### **1.3 A relação entre os imuno-complexos (IC) do soro de doentes com LES e produção de citocinas pró-inflamatórias**

A deposição de IC activa as diferentes APCs pela interacção com os seus Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII e Fc $\gamma$ RIII, iniciando uma cascata inflamatória de citocinas e quimiocinas. A libertação destes mediadores pro-inflamatórios culmina no dano celular.(13,40–43) O TNF- $\alpha$  pertence à grande família das citocinas e tem sido repetidamente associado ao LES, no entanto, o seu papel específico continua em debate. O TNF- $\alpha$  tem um papel importante na regulação auto-imune e é um mediador primário na resposta a organismos infecciosos, sendo inicialmente activado por fagócitos mononucleares, é também secretado por células NK, células T e mastócitos. Embora o TNF- $\alpha$  tenha um papel proeminente no combate a infecções, níveis elevados desta citocina têm vindo a ser associados com várias doenças auto-imunes. O tratamento com fármacos anti-TNF- $\alpha$  foi proposto como tratamento para o LES e é uma terapêutica activa para outras doenças auto-imunes, presumivelmente para regulação de produção de IFN- $\alpha$  pelas pDCs.(44)

O IFN- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica, importante na regulação imune que é produzida por múltiplos tipos celulares como resposta à infecção viral, sendo as pDCs a sua maior fonte. O IFN- $\alpha$  afecta diversas células envolvidas no LES e tem o potencial de influenciar o desenvolvimento, progressão e patogénese do LES, controlando a função e

estádios de activação dos mais importantes subtipos celulares, actuando como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa.(Figura 2)



**Figura 2** – Esquema indicando uma possível fonte e efeito do IFN- $\alpha$  no LES. (45)

A IL-6 é produzida em diversos tipos celulares, como monócitos, fibroblastos, células endoteliais, e também em células T e B, tendo várias actividades biológicas em vários alvos celulares. A IL-6 actua com um factor de diferenciação de diversas células hematopoiéticas. A diferenciação de células B no plasma e a produção de IgG é induzida pela IL-6, bem como a diferenciação e proliferação de células T e macrófagos. Adicionalmente, a IL-6 promove a maturação de células da medula óssea, activação de neutrófilos e estimulação e produção de plaquetas a partir de megacariócitos e diferenciação dos osteoclastos. A IL-6 é ainda o principal factor de estimulação do hepatócito e induz proteínas de fase aguda. Os doentes com LES activo têm níveis aumentados de IL-6 no soro e alguns estudos correlacionam-no com a actividade da doença ou níveis de anti-DNA. Níveis elevados de IL-6 estão associados com hiperactividade de células B e produção de anticorpos. A secreção de anticorpos anti-DNA é reduzida através da neutralização de IL-6 e restaurada adicionando IL-6 *in vitro*. Como a

IL-6 exerce efeitos sistémicos e também medeia inflamação local, a terapia direcionada para IL-6 tem mostrado eficácia em doenças auto-imunes, podendo ser promissora no tratamento de doentes com LES.(46)

#### **1.4 Características do soro de doentes com LES**

O soro de doentes com LES (particularmente durante os períodos de doença activa) contem factores capazes de induzir diferenciação e activação de DCs normais, nomeadamente IFN- $\alpha$  e factores indutores de INF- $\alpha$  como os IC contendo ácidos nucleicos. Outros elementos (ex. nucleossomas livres) capazes de induzir directamente maturação de DCs (definida pelo aumento da expressão de CD86, aumento da produção de IL-6, IL-8, IL-12, e aumento da indução da proliferação de células T) estão também presentes no soro de doentes com LES. Deste modo, vários estudos estabeleceram que o soro de doentes com LES é por si só, capaz de induzir a diferenciação e maturação de DCs de indivíduos saudáveis.(40)

Neste contexto, Blanco *et al* reportaram previamente que o soro de doentes com LES induz a diferenciação de monócitos de indivíduos saudáveis em DCs, e que este processo é dependente da presença de IFN- $\alpha$  no soro de doentes com LES. Esta particularidade sérica está ainda correlacionada com a actividade da doença e é específica do soro de doentes com LES.(47) Outros estudos corroboram o anterior, referindo que monócitos de indivíduos saudáveis expostos em cultura com soro de doentes com LES exibem morfologia e fenótipo característicos de DCs; reforçando que o soro de doentes com LES, que tem altos títulos de IFN- $\alpha$ , tem um grande efeito estimulatório na diferenciação de DCs, podendo ser inibido com a presença de imunoglobulinas intravenosas (preparações terapêuticas de IgG poliespecíficas).(48) Está também reportado que as DCs derivadas de monócitos, induzidas com soro de doentes com LES têm a capacidade de estimular células B *naive* e células B memória a diferenciar-se em plasmoblastos secretores de IgG e particularmente de IgA.(49) Bengtsson *et al* demonstraram ainda que o soro de doentes com LES induz apoptose em monócitos e linfócitos de indivíduos saudáveis, bem como em monócitos da linha celular U937 e células T da linha celular Jurkat. A indução de apoptose não se consegue observar com

soro proveniente de doentes com outras doenças auto-imunes como artrite reumatoide e vasculite sistémica, ou doenças infecciosas como mononucleose ou sepsis, ou indivíduos saudáveis; levando a concluir que os efeitos de indução de apoptose não estão relacionados com eventos inflamatórios não específicos, mas parecem ser específicos do LES. Estes factores indutores de apoptose, juntamente com o comprometimento da *clearance* do material apoptótico e uma elevada proporção de apoptose, resultam num aumento de carga de auto-antígenios em circulação, que poderão conduzir a respostas imunes e na formação de IC circulantes ou na sua deposição em tecidos, causando doença. No mesmo estudo pôde-se observar uma relação entre a elevada quantidade de TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas celulares e a apoptose nos monócitos. Hipoteticamente um factor solúvel no soro de doentes com LES consegue activar monócitos a produzir TNF- $\alpha$ , que consegue induzir a apoptose em células vizinhas via TNF receptor I.(50) Factores séricos como baixo níveis de componentes do complemento (Cq1 e C4), elevados níveis de anticorpos (anti-dsDNA e anticardiolipina) e citocinas estão directamente relacionados com a apoptose *in vitro*.(50)

## 2. Objectivos

Este trabalho teve como principal objectivo o estudo de um possível efeito estimulatório do soro de doentes com LES em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-/low</sup> do sangue periférico de indivíduos saudáveis.

### 2.1 Objectivos específicos

- 1) Quantificar a frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-/low</sup> produtores das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, bem como, a expressão das citocinas por célula, dada pela média de intensidade de fluorescência, após estimulação *in vitro* com LPS e com contacto com o soro de doentes com LES, em diferentes estádios da doença, comparando com o efeito produzido pelo soro de indivíduos controlo saudáveis.
- 2) Relacionar a expressão das citocinas nas células em estudo com parâmetros de actividade da doença, nomeadamente com o título de anticorpos anti-dsDNA, envolvimento cutâneo e nefrite lúpica.
- 3) Estudar a expressão génica de TNF- $\alpha$  nos monócitos, mDCs, DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-/low</sup> e Células T, separadas por *cell sorting*, após cultura com soro de doentes com LES, em diferentes estádios da doença, comparando com o efeito produzido pelo soro de indivíduos controlo saudáveis.
- 4) Determinar a concentração sérica de TNF- $\alpha$  em doentes com LES e de um grupo controlo e relacioná-la com parâmetros clínico-laboratoriais.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 População em estudo**

##### **3.1.1 Doentes**

Para o estudo funcional das células na presença do soro, 22 doentes seguidos no Serviço de Reumatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra – Hospitais da Universidade de Coimbra foram incluídos no estudo seguindo os critérios de classificação para o LES do *American College of Rheumatology*, 1997 (ACR).(6) Após avaliada a actividade da doença, de acordo com o *SLE Disease Activity Index 2000* (SLEDAI 2K), os doentes foram divididos em dois grupos, um com doença activa (LESA) (SLEDAI 2k  $\geq 5$ ; n = 11, 100% do sexo feminino, com uma média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $30 \pm 11$  anos) e outro com doença inactiva (LESI) (SLEDAI 2k  $<5$ ; n = 11, 72% do sexo feminino, com uma média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $29 \pm 10$  anos).

Para determinação da concentração sérica de TNF- $\alpha$ , foi usada uma população de maior dimensão, e representatividade semelhante. Deste modo, 64 doentes com LES seguidos no mesmo Centro foram igualmente divididos em dois grupos, um com doença activa (LESA) (SLEDAI 2k  $\geq 5$ ; n = 29, 97% do sexo feminino, com uma média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $30 \pm 11$  anos) e outro com doença inactiva (LESI) (SLEDAI 2k  $<5$ ; n = 35, 83% do sexo feminino, com uma média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $35 \pm 7$  anos).

Os dados demográficos, parâmetros clínicos adicionais e medicação em uso no momento da recolha das amostras, de ambas as populações encontram-se descritos na Tabela 2 e Tabela 3.

**Tabela 2** - Características clínicas dos 22 doentes com LES, utilizados para o estudo funcional das células na presença do soro.

	LES Activo (n=11)	LES Inactivo (n=11)
Média do <i>SLEDAI</i>	10.4 ± 4.1	1.5± 1.2
Tempo médio desde o diagnóstico	6.6 ± 6.0	8.3 ± 4.9
Lupus nefrite		
<i>Inactivo</i>	0%	54. 5%
<i>Activo</i>	45.5%	0%
Neuro lúpus	0%	18.2%
Lupus artrite		
<i>Inactivo</i>	72.7%	63.6%
Envolvimento Hematológico	100%	90.9%
Doença da pele	72.7%	72.7%
Lupus Severo <sup>(1)</sup>	45.5%	54.5%
Anticorpos Anti-dsDNA <sup>(2)</sup>		
<i>Negativo</i>	0%	27.3%
<i>Positivo Baixo</i>	9.1%	36.4%
<i>Positivo moderado</i>	18.2%	27.3%
<i>Positivo alto</i>	72.7%	9.1%
<b>Tratamento</b>		
Hidroxicloraquina	90.9%	90.9%
Imunossuppressores <sup>(3)</sup>	54.5%	36.4%
Esteróides <sup>(4)</sup>	90.9%	18.2%
<i>Dose baixa</i>	36.3%	18.2%
<i>Dose moderada</i>	27.3%	0%
<i>Dose elevada</i>	27.3%	0%

<sup>(1)</sup> Lupus severo é definido através do envolvimento de órgãos afectados.

<sup>(2)</sup> Anticorpos Anti-dsDNA: Negativo, <4.2 UI/ml. Positivo baixo, <20 UI/ml. Positivo moderado, 20-50 UI/ml. Positivo alto, >50 UI/ml;

<sup>(3)</sup> azatioprina, micofenolato de mofetil, ciclosporina, tacrolimus, ciclofosfamida, metotrexato ou rituximab;

<sup>(4)</sup> Dose baixa, até 10 mg/dia; dose moderada, entre 10-30 mg/dia; dose elevada, mais de 30 mg/ dia; n = tamanho da amostra. Os parâmetros clínicos foram avaliados desde o início da doença até ao tempo do estudo

**Tabela 3** - Características clínicas dos 64 doentes com LES, utilizados para determinar a concentração sérica de TNF- $\alpha$ .

	LES Activo (n=29)	LES Inactivo (n=35)
Tempo médio desde o diagnóstico	9.0 $\pm$ 5.0	8.2 $\pm$ 7.1
Lupus nefrite (LN)		
<i>Sem LN</i>	48.3%	45.7%
<i>LN Inactiva</i>	27.6%	54.3%
<i>LN Activa</i>	24.1%	
Lupus Severo <sup>(1)</sup>	38.0%	62.5%
Anticorpos Anti-dsDNA <sup>(2)</sup>		
<i>Negativo</i>	9.5%	41.7%
<i>Positivo Baixo</i>	9.5%	33.3%
<i>Positivo moderado</i>	19.1%	20.8%
<i>Positivo alto</i>	61.9%	4.2%
<b>Tratamento</b>		
Hidroxicloroquina	86.2%	91.4%
Imunossuppressores <sup>(3)</sup>	65.5%	28.6%
Esteróides <sup>(4)</sup>	85.8%	9.5%
<i>Dose baixa</i>	42.9%	9.5%
<i>Dose moderada</i>	28.6%	%
<i>Dose elevada</i>	14.3%	%

<sup>(1)</sup> Lupus severo é definido através do envolvimento de órgãos afectados.

<sup>(2)</sup> Anticorpos Anti-dsDNA: Negativo, <4.2 UI/ml. Positivo baixo, <20 UI/ml. Positivo moderado, 20-50 UI/ml. Positivo alto, >50 UI/ml;

<sup>(3)</sup> azatioprina, micofenolato de mofetil, ciclosporina, tacrolimus, ciclofosfamida, metotrexato ou rituximab;

<sup>(4)</sup> Dose baixa, até 10 mg/dia; dose moderada, entre 10-30 mg/dia; dose elevada, mais de 30 mg/ dia; n = tamanho da amostra. Os parâmetros clínicos foram avaliados desde o início da doença até ao tempo do estudo



### **3.1.2 Grupo Controlo**

O grupo controlo para o estudo funcional das células na presença de soro foi composto por 10 indivíduos saudáveis com características de género e idade semelhantes aos doentes considerados (90% do sexo feminino, com uma média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $29 \pm 4$  anos).

Para a determinação da concentração sérica de TNF- $\alpha$ , o grupo controlo foi composto por 27 indivíduos saudáveis, igualmente com características de género e idade semelhantes aos doentes considerados (89% do sexo feminino, com uma média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $30 \pm 7$  anos).

Todos os participantes foram convidados a completar um breve questionário referente à sua medicação actual ou passada. Deste modo, foi excluída a possibilidade de doença auto-imune, história familiar de doenças auto-imunes, presença de qualquer estado inflamatório activo e tratamento com drogas imunomoduladoras.

## **3.2 Amostras**

As amostras de sangue dos doentes com LES e população controlo foram colhidas para tubos de soro, centrifugadas e o soro separado para alíquotas que foram guardadas a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até ao momento da análise.

## **3.3 Ética**

O protocolo do estudo foi aprovado pela comissão ética local, e todos os participantes assinaram o seu consentimento informado.

### **3.4 Estimulação *in vitro* de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> com soro de doentes com LES**

Para avaliar o efeito dos soros de doentes com LES em células de indivíduos saudáveis, foram colhidas 5 amostras de indivíduos saudáveis (90% do sexo feminino, com uma média de idade  $\pm$  desvio padrão de  $29 \pm 3$  anos) para tubos com heparina como anticoagulante. As amostras foram lavadas três vezes com soro fisiológico (NaCl) a 0,9% de modo a remover a presença de imunoglobulinas livres presentes na amostra de plasma. De seguida, as amostras foram diluídas 1/1 (vol/vol), em meio RPMI-1640 (Gibco; Paisley, Escócia, Reino Unido) suplementado com 2mM de L-glutamina, num total de 500  $\mu$ L, na presença de 10  $\mu$ g/mL de Brefeldina A (Sigma, St. Louis, MO, EUA) de modo a impedir a libertação de citocinas. Adicionou-se ainda 100 ng/mL de Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (serotipo 055:B5; Sigma, St. Louis, MO, EUA) de modo a obter um efeito estimulador e 50  $\mu$ L do soro em estudo. Todos os ensaios incluíram uma amostra sem estímulo como controlo negativo e uma amostra com LPS e sem soro como controlo positivo. Todas as amostras foram incubadas a 37°C num ambiente estéril e atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>, durante 6 horas.(51,52)

### **3.5 Avaliação da expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ pelos monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>, por citometria de fluxo**

Após o período de incubação, todas as amostras foram aliquotadas em diferentes tubos (250  $\mu$ L/tubo) de modo a analisar a expressão de cada citocina em estudo, produzidas pelos monócitos e DCs. De modo a identificar os monócitos, as mDCs, e as DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>, as células foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais (mAc): 2,5  $\mu$ L de anti-CD45 Krome Orange (clone:J.33;Beckman Coulter, Brea, CA, EUA); 2,5  $\mu$ L de anti-CD14 Aloficocianina (clone: RM052; Beckman Coulter); 2,5  $\mu$ L de anti-CD33 Ficoeritrina Cianina 7 (clone: D3HL60.251; Beckman Coulter).

Após homogeneização suave no vórtex, Incubou-se durante 15 min no escuro e à temperatura ambiente, seguiu-se um protocolo de fixação e permeabilização com o Kit IntraPrep (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

De seguida adicionou-se 1,5  $\mu$ L de anti-TNF- $\alpha$  conjugado com Fluoresceína de Isotiocianato (FITC) (clone Mab11; BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA) e 10  $\mu$ L de anti-IL-6 conjugado com Ficoeritrina (clone MQ2-6A3; Pharmingen). Os tubos foram incubados 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro, e depois as células foram lavadas duas vezes com PBS (540xg durante 5 minutos) e ressuspendidas em 250 $\mu$ L de PBS (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.4, 10x GIBCO, EUA).

### **3.6 Avaliação da expressão da IgG ligada nos monócitos, mDCs, pDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>, por citometria de fluxo**

De modo a avaliar a expressão de IgG nos monócitos, DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>, mDCs e pDCs de indivíduos saudáveis, numa amostra controlo aleatória e procedeu-se a um protocolo de marcação de membrana utilizando a seguinte combinação de anticorpos monoclonais para identificar monócitos, mDCs, DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>, e pDCs: anti-CD14 Aloficocianina Helite 7 (clone: M $\phi$ P9; BD Biosciences, San Jose, EUA), anti-CD33 Ficoeritrina Cianina 7 (clone: D3HL60.251; Beckman Coulter), anti-HLA-DR proteína peridina-clorofila-cianina 5.5 (clone: G46-6, BD Biosciences), anti-CD45 Pacific Orange (clone: HI30 Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), anti-CD123 Aloficocianina (clone: 763 BD Pharmingen) e CD16 Pacific Blue (clone: 3G8; BD Pharmingen). A expressão da IgG ligada a estas células foi avaliada pela adição de anti-IgG (clone: G18-145; BD Pharmingen). Foram incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. De seguida, procedeu-se à lise dos eritrócitos, adicionando-se 2 mL de FACS Lysing Solution (1X) (BD Biosciences), previamente diluído a 1:10 em água destilada. Incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Centrifugou-se durante 5 minutos a 540xg e decantou-se o sobrenadante. Por fim, adicionou-se 1 mL de PBS (1X) (Phosphate-Buffered Saline, pH 7.4, 10x GIBCO, EUA) previamente diluído a 1:10 em água destilada. Centrifugou-se a 540xg durante 5 minutos. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com 0,250 mL de PBS (1x) antes da aquisição no citómetro.

### 3.7 Aquisição no citómetro de fluxo e análise

As amostras foram adquiridas no citómetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciense) configurado com três lasers: azul (488-nm, refrigerado, 20-mW estado sólido), vermelho (633-nm, 17-mW HeNe) e violeta (405nm, 30-mW estado sólido) e com recurso à aplicação informática FACSDiva (BD Biosciense).

A análise dos dados obtidos de cada variável em estudo foi efectuada através do programa Infinicyt 1.6 (Cytognos, Salamanca, Espanha). A avaliação da expressão de citocinas foi baseada na percentagem de células positivas entre cada subpopulação celular e/ou a sua média de intensidade de fluorescência (MIF), expressa numa escala lógica relativa.

### 3.8 Análise da expressão génica relativa após separação celular de monócitos, mDCs, DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> e Células T

De forma a avaliar o efeito directo do soro de doentes com LES na expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  nos monócitos e células dendríticas de indivíduos normais (sem o efeito cumulativo de LPS), uma amostra de sangue periférico de um indivíduo saudável, colhida em tubo heparinizado foi lavada três vezes com soro fisiológico, NaCl a 0.9% e foi diluída 1/1 (vol/vol), em meio RPMI-1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina e foram adicionados 50 $\mu$ L de soro, perfazendo um volume final de 500  $\mu$ L. Seis soros de doentes com LES foram seleccionados e agrupados de acordo com a quantidade de anticorpos anti-dsDNA em negativo/baixo positivo (<20 IU) (n=2) e moderado/alto positivo (20->50 IU) (n=4) e foram também incluídos três soros de indivíduos controlo. Foi incluída uma amostra sem estímulo, onde não foi adicionado soro. Cada amostra foi incubada durante 6 horas, a 37.°C num ambiente estéril em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a separação celular de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> e células T, cada amostra foi lisada com 10 mL de solução de NH<sub>4</sub>CL (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Após 20 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas (5 minutos, a 540 g) e o *pellet* celular foi marcado com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD45 pacific orange (clone: HI30 Invitrogen), anti-HLA-DR, isotiocianato de fluoresceína (clone:

Immu-357 Beckman Coulter), anti-CD123 alofococianina (clone: 763 BD Pharmingen), anti-CD14 proteína peridina-clorofila-cianina 5.5 (clone:M5E2 BD Pharmingen), anti-CD3 pacific blue (clone:UCHT1 BD Pharmingen), anti-CD33 ficoeritrina (clone:P67.6 BD Biosciences.). Após incubação de 20 minutos à temperatura ambiente e no escuro, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão-fosfato salino (PBS) (Gibco BRL-life Technologies, Viena, Áustria).

A separação celular e purificação foram efectuadas no separador celular FACSAria II (BD Biosciense) usando a aplicação informática FACSDiva (BD Biosciense). Os monócitos foram identificados e separados pelo fenótipo HLA-DR<sup>+</sup>/CD14<sup>high</sup>/CD33<sup>high</sup>/CD45<sup>high</sup>; e as três subpopulações de DCs caracterizadas por tamanho intermédio (FSC) e complexidade (SSC) entre os linfócitos e os monócitos, foram purificadas de acordo com o seguinte imunofenótipo: DCs mielóides (mDCs) com HLA-DR<sup>high</sup>/CD33<sup>high</sup>/CD14<sup>neg</sup>/CD123<sup>neg</sup>, a subpopulação de DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> com HLA-DR<sup>inter</sup>/CD33<sup>inter</sup>/CD123<sup>neg</sup>, a subpopulação de DCs plasmocitóides (pDCs) com HLA-DR<sup>int</sup>/CD123<sup>high</sup>CD33<sup>neg/dim</sup> e por último, as células T com base na expressão de CD3.

As populações separadas foram centrifugadas durante 5 minutos a 300 g e o pellet celular foi ressuspensado em 350 µL de Tampão Lisante RLT (Qiagen, Hilden, Alemanha) e a extracção de RNA total foi efectuada com o kit Micro RNeasy (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA Total foi eluado em 14 µL de volume de água purificada sem RNase. De modo a quantificar o total de RNA extraído e verificar a integridade do RNA, as amostras foram analisadas usando o kit Nano Chip 6000, no bioanalisador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Walbronn, Germany), com o software 2100, de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi transcrito de forma reversa com o SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix para qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da expressão génica relativa por PCR foi efectuada no LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). As reacções da PCR em Tempo Real foram extraídas usando 1 X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 1 X QuantiTect Assay (Quiagen) and 20 ng de amostra de cDNA, num volume total de 10µL. As reacções foram efectuadas usando o seguinte perfil térmico: 15 min a 95°C, e 50 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C. Foram efectuadas análises ao ponto de fusão para assegurar a amplificação do produto específico. Os resultados da PCR em Tempo Real

foram analisados com o *software* LightCycler (Roche Diagnostics). O kit GeNorm Reference Gene Selection (PrimerDesign Ltd., Southampton, Inglaterra) em conjunto com o *software* geNorm (PrimerDesign Ltd) foram usados para seleccionar os genes de referência e normalizar os dados. Os genes de referência usados para a análise da expressão génica nos monócitos foram o ATP synthase (ATP5B) e o beta-2-microglobulin (B2M); nas mDCs e DCs CD14<sup>-</sup>/<sup>low</sup>CD16<sup>+</sup> foram a B2M e ubiquitin-c (UBC); nas pDCs foram o B2M e ATP5B. A expressão génica normalizada com níveis de expressão esperados foram calculados usando o método delta-Ct.(53)

### **3.9 Determinação da concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LES**

Para determinar a concentração sérica de TNF- $\alpha$ , as amostras foram processadas segundo as instruções do fabricante do kit da MILLIPLEX MAP Human TH17 Magnetic Bead Panel Premixed - 25 Plex - Immunology Multiplex Assay, numa plataforma Luminex® xMAP® em formato magnético, da Millipore – Merck; em colaboração com o Professor Howard Young, do Laboratório de Imunologia Experimental do Centro de Pesquisa do Cancro – Instituto Nacional do Cancro - Frederick – EUA.

### **3.10 Tratamento estatístico**

A análise estatística foi realizada com o *software* SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA).

Foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney U, para apurar o significado estatístico das diferenças observadas entre os grupos (doentes com LES em diferentes estádios e indivíduos controlo), para as várias características em estudo.

As diferenças estatísticas foram considerada quando *p value* < 0,05.

## 4. Resultados

### 4.1 Frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-/low</sup> produtores das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6, bem como, a expressão das citocinas por célula, após estimulação *in vitro* com LPS e com contacto com o soro de doentes com LES

Com o intuito de apurar o efeito estimulatório do soro de doentes com LES nos monócitos, células dendríticas mieloides e células dendríticas CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> do sangue periférico de indivíduos saudáveis, avaliou-se a frequência destas células produtoras de TNF- $\alpha$  e IL-6, e a expressão destas citocinas, traduzida pela média de intensidade de fluorescência (MIF), após estimulação *in vitro* com LPS e simultaneamente com soro de doentes com LES, em diferentes estádios da doença, comparando com o efeito produzido pelo soro de indivíduos controlo saudáveis.

Neste sentido, fizeram-se vários ensaios com diferentes volumes de soro, verificando-se que diferentes quantidades de soro não influenciavam a estimulação, estipulando-se como volume padrão 50 $\mu$ L de soro. Verificou-se que quando as células normais era colocadas em contacto apenas como os soros dos doentes (sem adição simultânea de LPS) não resultava em alterações significativas. Por outro lado, quando as células normais eram colocadas em contacto com os soros e simultaneamente eram estimuladas com LPS, conduziam a alterações significativas na expressão das citocinas em estudo. Todos os ensaios incluíram um controlo da produção espontânea de citocinas (basal), um controlo de células estimuladas apenas com LPS, e um ensaio com células colocadas em contacto com as amostras de soro e estimuladas simultaneamente com LPS.

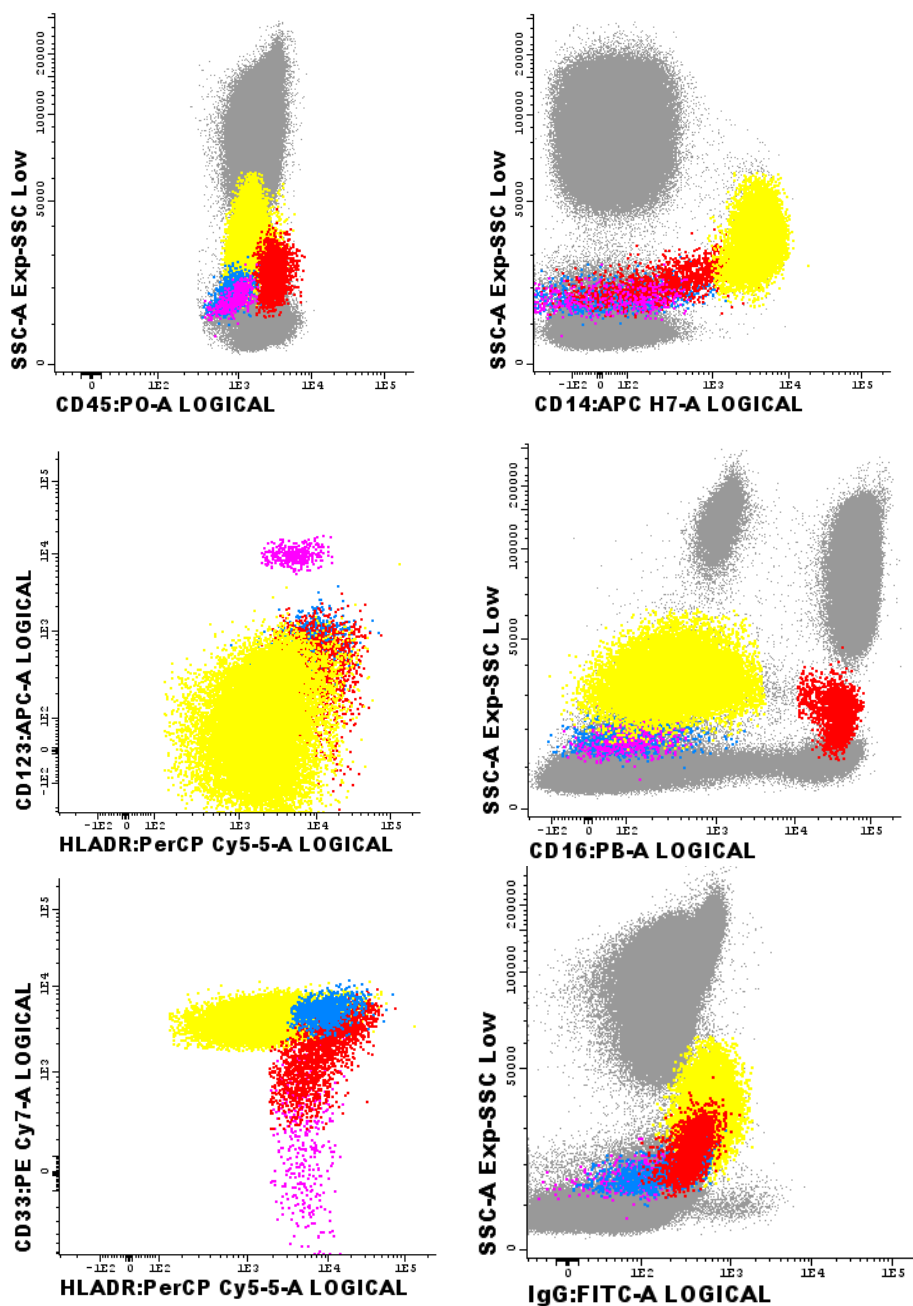
Adicionalmente avaliou-se a capacidade de ligar IgG das células em estudo, observando-se que os monócitos e as DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> apresentam uma maior capacidade de ligar IgG na membrana, relativamente a mDCs e pDCs, reflectindo a ligação de IgG a diferentes Fc $\gamma$ R.

De modo a identificar inequivocamente as diferentes populações e subpopulações celulares, houve necessidade de definir uma estratégia para aquisição no citómetro e posteriormente no *sorting* celular. Deste modo, os monócitos foram identificados através de HLA-DR<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup>/CD16<sup>neg</sup>/CD123<sup>+</sup>. As DCs foram identificadas pelas características intermédias para tamanho (*Forward Scatter* – *FSC*) e dispersão lateral da luz (*Side Scatter* – *SSC*) entre os linfócitos e monócitos e com o seguinte fenótipo:

- mDCs CD123<sup>low</sup>/CD33<sup>high</sup>/CD16<sup>neg</sup>, com expressão forte de HLA-DR
- DCs CD14<sup>-/low</sup> CD16<sup>+</sup>, com expressão de CD123<sup>inter</sup>/CD33<sup>inter</sup>/CD16<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>inter</sup>

A figura abaixo demonstra esquematicamente a estratégia utilizada.(14)





### Identificação de monócitos e subpopulações de DCs:

**Monocytes:** HLA-DR<sup>+</sup> /CD45<sup>high</sup>/CD16<sup>neg</sup>/CD123<sup>+</sup> (**amarelo**)

**DCs CD14<sup>-/low</sup>CD16<sup>+</sup>:** HLA-DR<sup>inter</sup>/CD33<sup>inter</sup>/CD45<sup>high</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD123<sup>inter</sup> (**vermelho**)

**mDCs:** HLA-DR<sup>high</sup>/CD33<sup>high</sup>/CD45<sup>inter</sup>/CD16<sup>neg</sup>/CD123<sup>low</sup> (**azul**)

**pDCs:** HLA-DR<sup>high</sup>/CD33<sup>neg/low</sup>/CD45<sup>inter</sup>/CD16<sup>neg</sup>/CD123<sup>high</sup> (**rosa**)

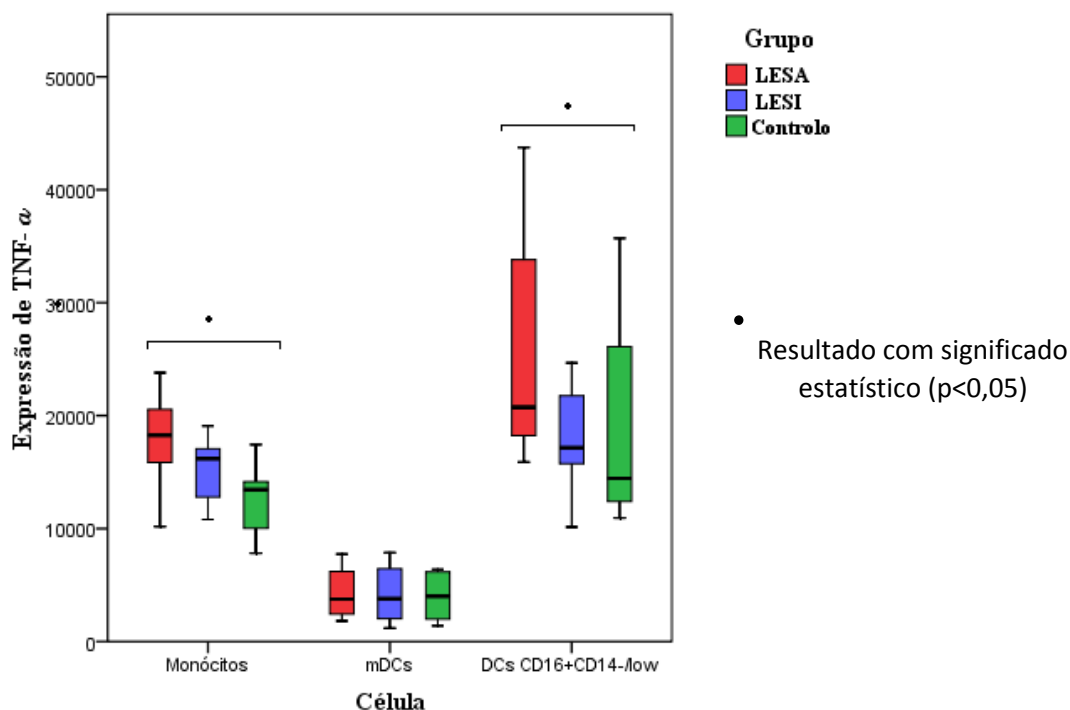
**Figura 3** - Estratégia para isolar monócitos, e as diferentes populações de DCs por citometria de fluxo e representação da expressão de IgG pelas diferentes células.

Não foram verificadas diferenças na frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> que expressam IL-6 e TNF- $\alpha$  em amostras com adição de soro de doentes com LES (grupo LESA ou LESI) quando comparado com adição de soro do grupo controlo. (Tabela 3) Deste modo, cerca de 96.24%  $\pm$ 1.61 monócitos sujeitos a estimulação com soro de doentes com LESA, com LESI ou com soro controlo apresentam produção de TNF- $\alpha$  e cerca de 93.43% $\pm$ 4.03 monócitos produzem IL-6. Relativamente às mDCs dos diferentes grupos estudados, 54.97% $\pm$ 18.32 produzem TNF- $\alpha$  e 72.33% $\pm$ 13.82 produzem IL-6. Por último, 92.87% $\pm$ 6.71 das DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-/low</sup> dos diferentes grupos apresentam produção de TNF- $\alpha$  e 59,85 $\pm$ 17,64 apresentam produção de IL-6.

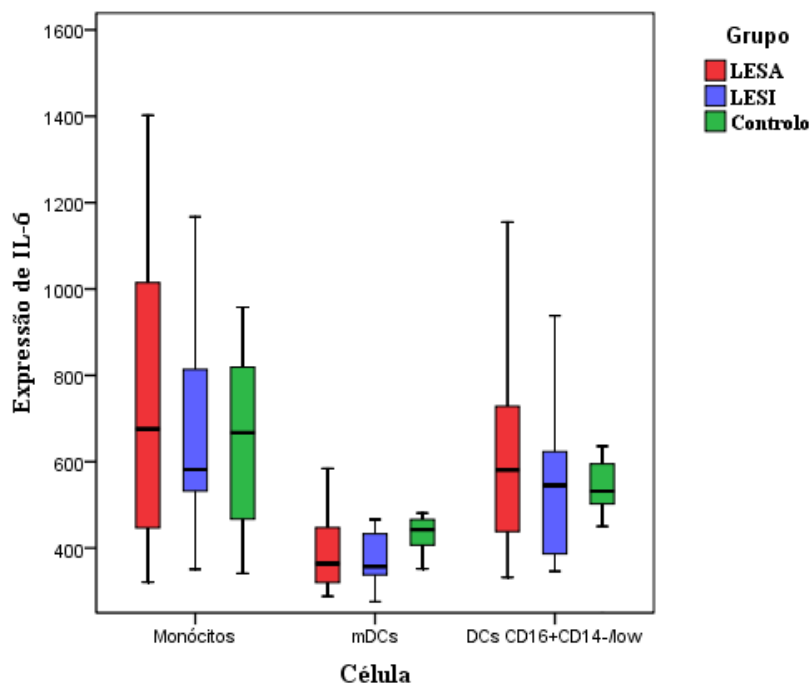
**Tabela 4** - Frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-/low</sup> produtores de TNF- $\alpha$  e IL-6 após estimulação com LPS e respectivamente soros de LESA, LESI e de um grupo controlo.

	Monócitos		mDCs		DCs CD16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-/low</sup>	
	% TNF- $\alpha$	% IL-6	% TNF- $\alpha$	% IL-6	% TNF- $\alpha$	% IL-6
<b>Controlo</b>	95.84 $\pm$ 1.40	92.13 $\pm$ 4.90	62.42 $\pm$ 13.10	71.23 $\pm$ 13.94	93.32 $\pm$ 6.97	55.36 $\pm$ 17,58
<b>LESI</b>	96.00 $\pm$ 1.56	94.52 $\pm$ 2.89	52.38 $\pm$ 20.85	75.27 $\pm$ 12.18	93.54 $\pm$ 5.33	59,23 $\pm$ 17.35
<b>LESA</b>	96.84 $\pm$ 1.79	93.52 $\pm$ 4.30	50.72 $\pm$ 20.03	70.40 $\pm$ 16.22	91,75 $\pm$ 7.84	64.97 $\pm$ 18.00

No que diz respeito à produção de citocina por célula, traduzida pela MIF, observou-se um aumento na expressão de TNF- $\alpha$ , nos monócitos (p=0,006), e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> (p=0,049), quando em contacto com soro LESA comparativamente com o efeito produzido pelo soro controlo. Verifica-se ainda que este efeito é maior consoante a actividade da doença, pois observa-se um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  nos monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> em contacto com soro LESA comparativamente com soro LESI, embora sem significado estatístico. Em relação às mDCs, não se verificaram diferenças no que diz respeito à expressão de TNF- $\alpha$  entre os diferentes soros.(Gráfico 1) Adicionalmente, não foram encontradas diferenças no que diz respeito à expressão de IL-6 em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> quando comparados os efeitos do soro de doentes com LESA, LESI e soro controlo.(Gráfico 2)



**Gráfico 1** – Expressão de TNF- $\alpha$  (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> de indivíduos saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente com soro LESA , LESI e soro controlo.



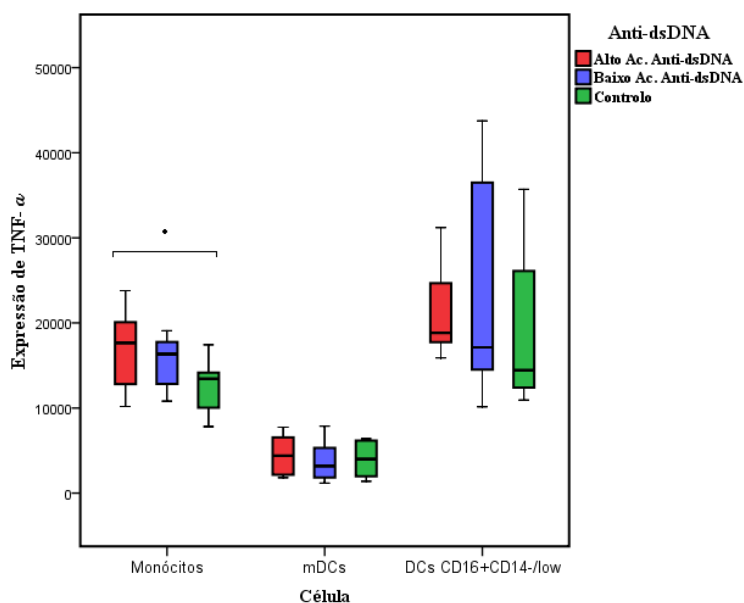
**Gráfico 2** – Expressão de IL-6 (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente soro LESA , LESI e soro controlo.

#### 4.1.1 Relação com a quantidade de anticorpos anti-dsDNA e o efeito produzido pelos soros dos doentes com LES

De modo a relacionar a quantidade de anticorpos anti-dsDNA com a expressão de citocinas nas células em estudo, os doentes com LES foram agrupados de acordo com o título de anticorpos anti-dsDNA em negativo-positivo baixo (<20IU) (Baixo Ac. anti-dsDNA) e moderado-positivo alto (20->50IU) (Alto Ac. anti-dsDNA). Foi observada uma maior expressão de TNF- $\alpha$  por monócitos em contacto com soro Alto Ac. anti-dsDNA quando comparada com o estímulo produzido pelo contacto com o soro Baixo Ac. anti-dsDNA, apresentando significado estatístico ( $p=0,006$ ) quando comparada com o grupo controlo.

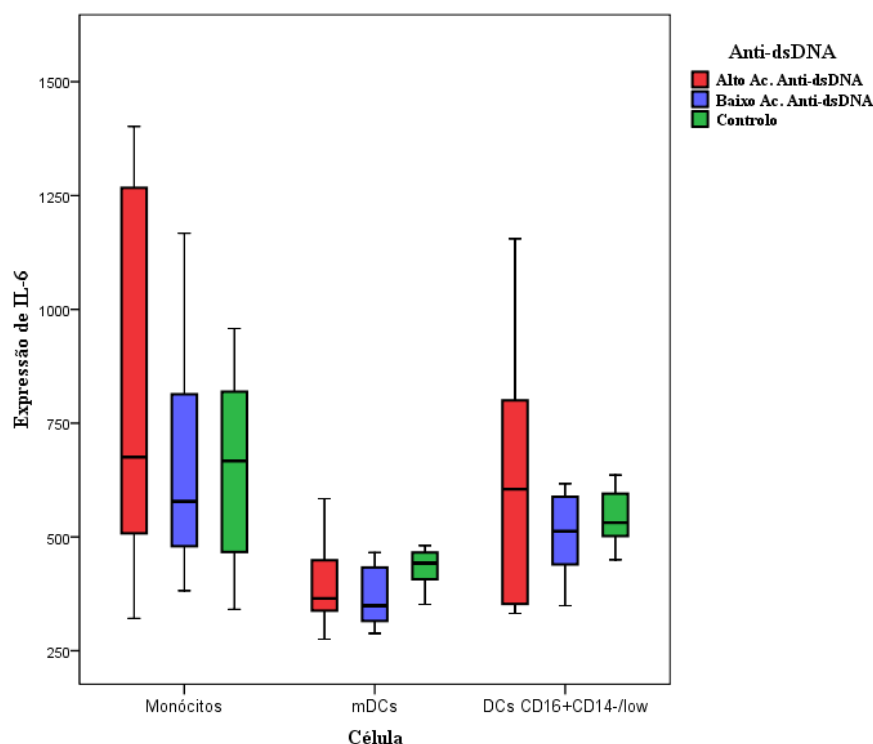
Semelhante aos monócitos, nas DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> foi observada uma maior expressão de TNF- $\alpha$  quando em contacto com soro Alto Ac. anti-dsDNA comparando o estímulo produzido pelo contacto com o soro Baixo Ac. anti-dsDNA e soro controlo, mas não se observou significado estatístico.

Não foram verificadas diferenças no que diz respeito à expressão de TNF- $\alpha$  por mDCs quando comparados os efeitos dos diferentes soros. (Gráfico 3)



**Gráfico 3** – Expressão de TNF- $\alpha$  (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto, respectivamente, soro de doentes com LES com diferentes títulos de Ac. Anti-dsDNA e soro controlo.

Relativamente à expressão de IL-6 por monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> de indivíduos saudáveis, após contacto com soro de doentes com Alto Ac. anti-dsDNA, Baixo Ac. anti-dsDNA e controlo não foram encontradas diferenças. (Gráfico 4)



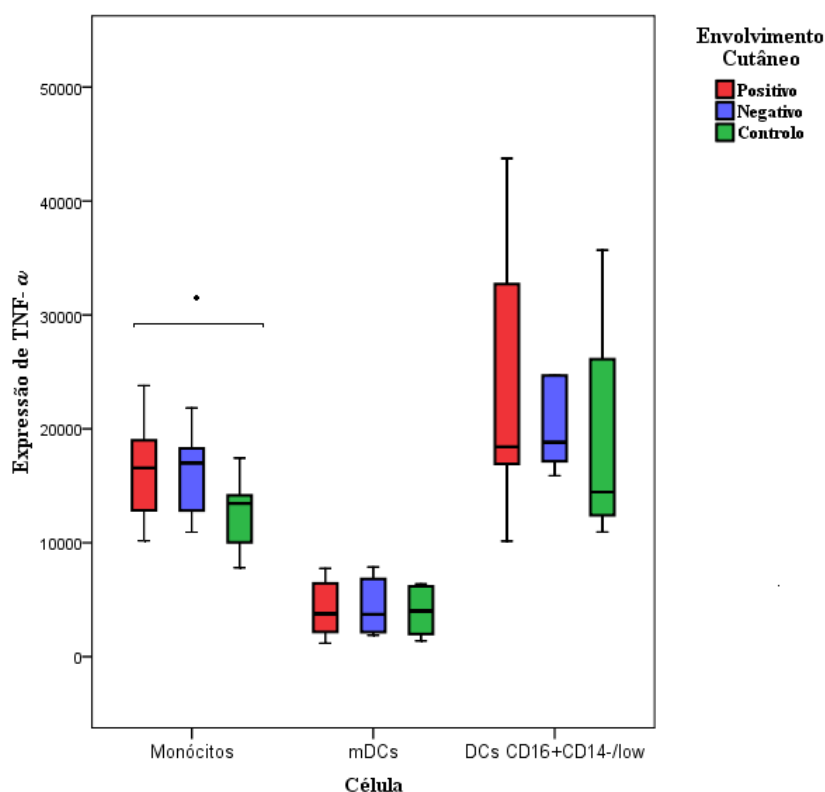
**Gráfico 4** – Expressão de IL-6 (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente soro de doentes com LES com diferentes títulos de Ac. Anti-dsDNA e soro controlo.

#### 4.1.2 Relação com os parâmetros clínicos dos doentes e o efeito produzido pelos soros dos doentes com LES

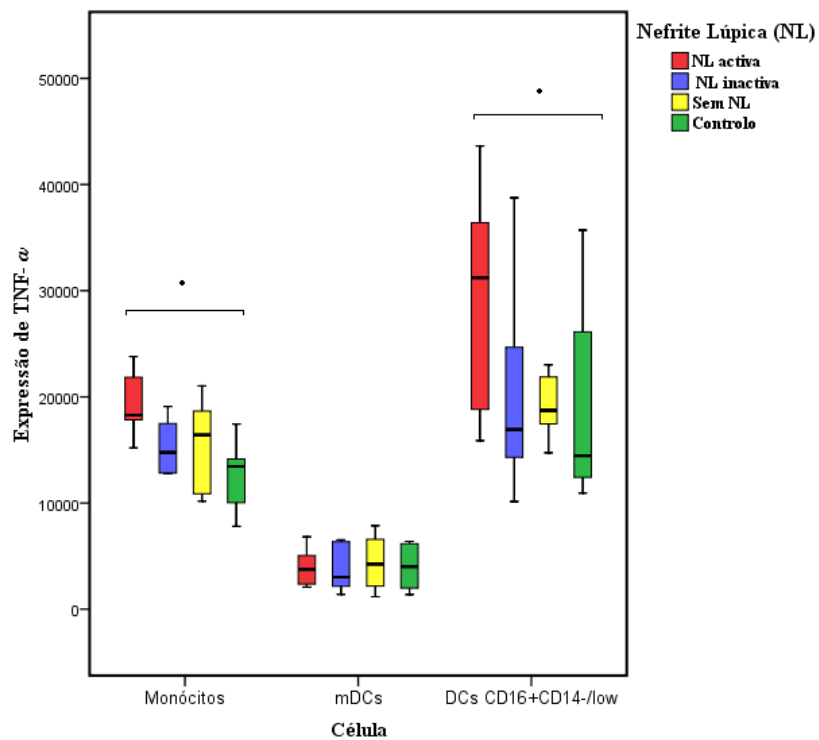
Relacionando parâmetros clínicos de doentes com LES foi observado, em monócitos em contacto com soro de doentes com LES com envolvimento cutâneo, uma maior expressão de TNF- $\alpha$  quando comparado com o efeito produzido pelo soro controlo ( $p=0.023$ ). Não foram observadas diferenças comparando a expressão de TNF- $\alpha$  entre monócitos em contacto com o soro de indivíduos controlo e doentes com LES sem

envolvimento cutâneo, nem nas mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> entre os grupos considerados. (Gráfico 5) Do mesmo modo não foram encontradas diferenças na expressão de IL-6 nestas células, entre os grupos estudados, bem como na frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> que expressam IL-6 e TNF- $\alpha$ .

Simultaneamente, monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup>, em contacto com soro de doentes com LES com nefrite lúpica activa, demonstraram uma maior expressão de TNF- $\alpha$ , quando comparada com o efeito do soro controlo (p=0,003); não se encontraram diferenças entre o efeito produzido pelo soro de doentes que nunca tiveram nefrite lúpica ou inactiva. Não foram observadas diferenças relativamente à expressão de IL-6, assim como não se verificou qualquer tendência na frequência de células que expressam IL-6 e TNF- $\alpha$ . (Gráfico 6)



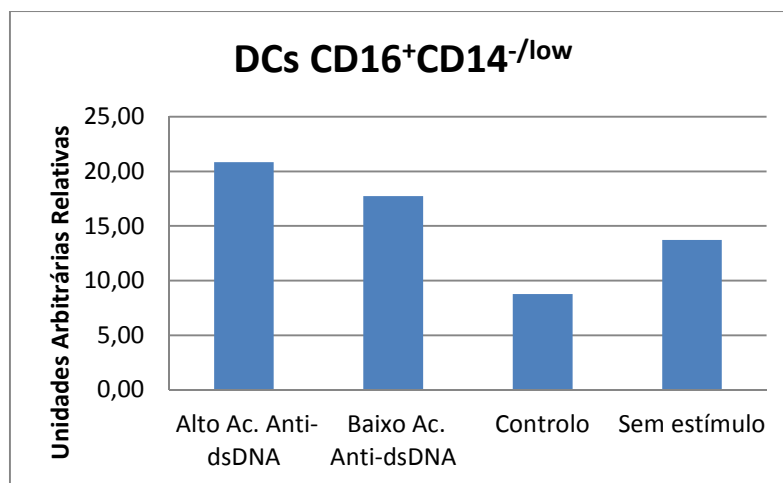
**Gráfico 5** – Expressão de TNF- $\alpha$  (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente com soro de doentes com LES com diferente envolvimento cutâneo e soro controlo.



**Gráfico 6** – Expressão de TNF- $\alpha$  (dada pela MIF) em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> saudáveis após estimulação com LPS e em contacto respectivamente com soro de doentes com LES com diferentes estádios de nefrite lúpica e soro controlo.

## 4.2 Expressão génica relativa de TNF- $\alpha$ em monócitos, mDCs, DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> e células T do sangue periférico, obtidos por separação celular, após estimulação com soro de doentes com LES

A expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  foi avaliada em monócitos, mDCs, DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> e células T do sangue periférico, obtidos a partir de separação celular e após contacto com soro de doentes com LES. Deste modo, 6 soros de doentes com LES foram agrupados de acordo com a quantidade de anticorpos em Baixo Ac. anti-dsDNA (<20IU) e Alto Ac. anti-dsDNA (20->50IU). Não foram observadas diferenças na expressão de TNF- $\alpha$  dos monócitos quando em contacto com soro de doentes com LES quando comparado com o soro controlo ou sem qualquer estímulo. Relativamente às DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> foi observada uma maior expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  em amostras com Alto Ac anti-dsDNA, quando comparado com o soro controlo ou amostras sem estímulo. Embora menos evidente, também foi observado um aumento da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  em amostras em contacto com soro com Baixo Ac. anti-dsDNA, quando comparado com soro controlo ou ausência de estímulo. Nas mDCs não foram encontradas diferenças. No que diz respeito à população de células T também não foram encontradas diferenças entre as populações em estudo.

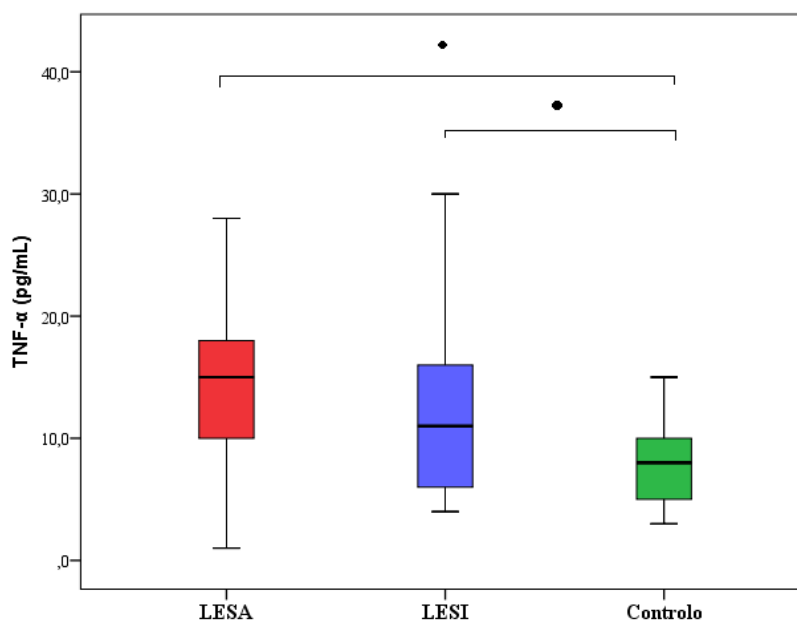


**Gráfico 7** – Estudo da expressão génica de TNF- $\alpha$  nas DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup>, após contacto *in vitro* com os diferentes soros.



### 4.3 Concentração sérica de TNF- $\alpha$ em doentes com LES

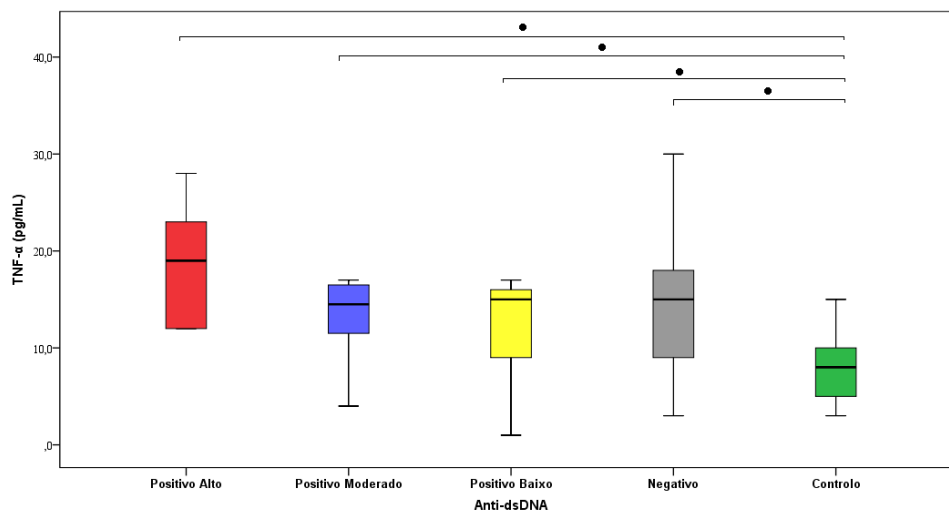
De modo a clarificar a constituição sérica dos doentes com LES e no seguimento dos resultados anteriores, em que foi observada uma maior expressão de TNF- $\alpha$  em monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup>, foi avaliada a concentração sérica de TNF- $\alpha$  na nossa população em estudo. Verificou-se um aumento, estatisticamente significativo ( $p=0.001$ ), da concentração sérica de TNF- $\alpha$  em doentes com LESA quando comparado com o grupo controlo. Este aumento está correlacionado com a actividade da doença, uma vez que doentes com LESA apresentam maior concentração sérica de TNF- $\alpha$  que os doentes com LESI quando são comparados com o grupo controlo, ( $p=0.031$ ). (Gráfico 8)



**Gráfico 8** – Concentração sérica de TNF- $\alpha$  em doentes com LESA, LESI e grupo controlo.

#### 4.3.1 Relação com a quantidade de anticorpos anti-dsDNA

Avaliando a relação entre a concentração de TNF- $\alpha$  solúvel e os títulos de ac. anti-dsDNA, verificámos que a concentração sérica de TNF- $\alpha$  está relacionada com a presença de ac, anti-dsDNA no soro, destacando-se uma maior concentração de TNF- $\alpha$  em doentes com um alto título de ac. anti-dsDNA ( $p < 0,001$ ).

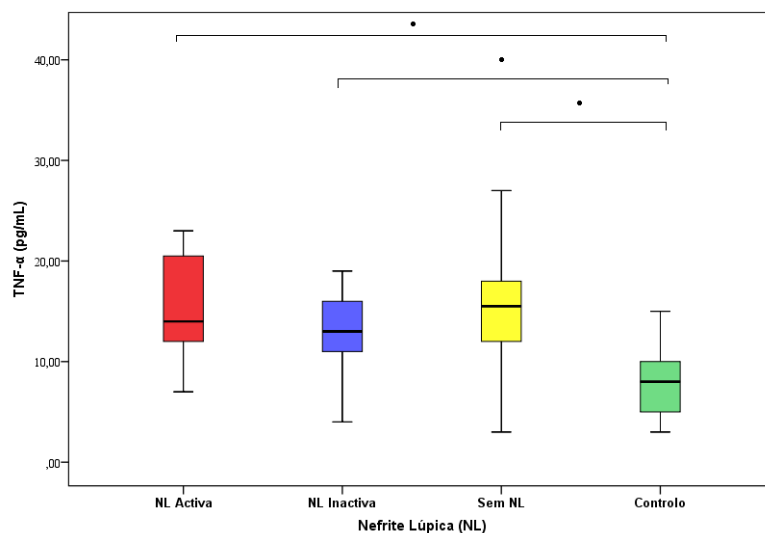


**Gráfico 9** – Concentração sérica de TNF- $\alpha$  em doentes com LES com diferentes títulos de Ac. Anti-dsDNA e soro controlo.

#### 4.3.2 Relação com os parâmetros clínicos dos doentes com LES

Verificou-se ainda que a concentração sérica de TNF- $\alpha$  está relacionada com manifestações clínicas secundárias ao LES, como a Nefrite Lúpica (NL). Deste modo observou-se uma maior concentração de TNF- $\alpha$  no soro de doentes com NL activa quando comparado com os controlos ( $p=0,004$ ), verificando-se também diferenças nos doentes com NL inactiva ( $p=0,002$ ) e doentes que nunca tiveram NL ( $0,001$ ), quando comparados com os

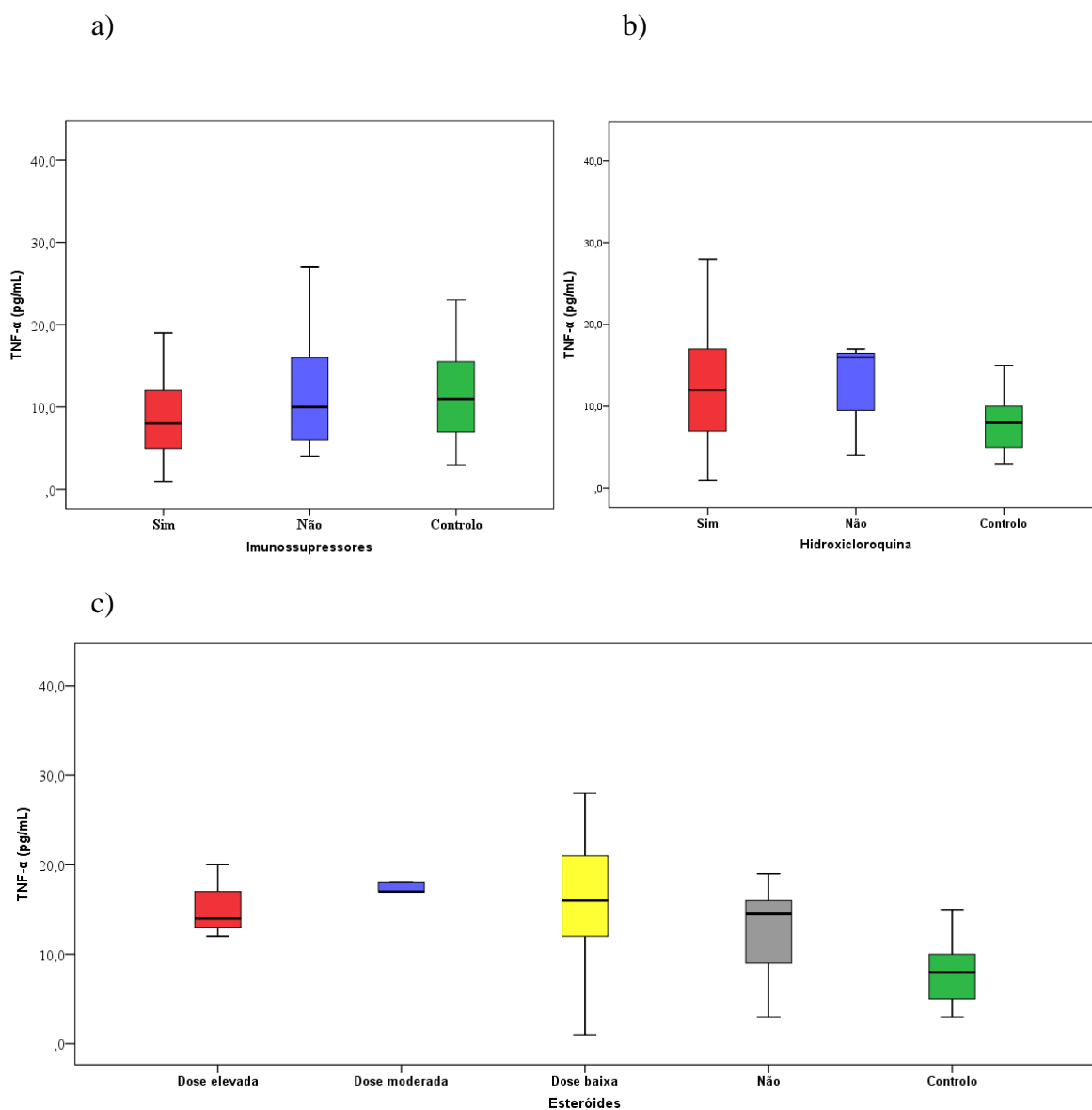
controlos.



**Gráfico 10** – Concentração sérica de TNF- $\alpha$  em doentes com LES com diferentes estádios de nefrite lúpica e soro controlo.

### 4.3.3 Relação com a terapêutica dos doentes com LES

Uma vez avaliada a relação entre a concentração sérica de TNF- $\alpha$  e os diferentes estádios da doença e manifestações clínico-laboratoriais, averiguou-se também uma potencial relação entre a terapêutica e a concentração sérica de TNF- $\alpha$ . Não foram, no entanto, encontradas diferenças entre a concentração sérica de TNF- $\alpha$  nos doentes que fazem e não fazem terapêutica com imunossuppressores, hidroxicloraquina e esteróides. (Gráfico 11)



**Gráfico 11** – Estudo da concentração sérica de TNF- $\alpha$  em doentes com LES com diferentes doses terapêuticas de a) imunossuppressores , b) hidroxicloraquina ou c) esteróides.

## 5. Discussão

Os avanços recentes no conhecimento do Sistema Imune levaram a um reconhecimento crescente da importância dos componentes do sistema imune inato na detecção de antígenos do próprio no LES.(17,54) O LES é caracterizado pela produção de anticorpos e formação de imuno-complexos (IC), que provocam dano celular induzido pela activação do sistema imune inato.(55) Neste contexto, já foram descritas anormalidades em monócitos e DCs de doentes com LES,(17,37) bem como já foi referenciada a importância das DCs na patogénese do LES(40,41) e a sobreexpressão de diversas citocinas no soro de doentes com LES (ex: Blys, IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-10 IFN- $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) (44,56–59); no entanto, pouco se conhece acerca do efeito inflamatório que os mediadores solúveis, presentes no soro de doentes com LES, provocam nas células de indivíduos normais.

Deste modo, procurou-se a avaliar o efeito estimulatório do soro de doentes com LES nos monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-/low</sup> do sangue periférico de indivíduos saudáveis, avaliado pela expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6, após estimulação *in vitro* com LPS e na presença de Brefeldina-A, durante 6 horas, adaptando o modelo documentado por Bueno *et al*,(52) adicionando simultaneamente soro de doentes com LES. Os resultados, obtidos no nosso estudo, demonstraram não haver diferenças na frequência de monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> que produziam IL-6 e TNF- $\alpha$  em amostras com adição de soro de doentes com LES (grupo LESA ou LESI) quando comparado com adição de soro do grupo controlo. No entanto, ao avaliar a quantidade de citocina produzida por célula, verificou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão de TNF- $\alpha$ , nos monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup>, quando na presença de soro de LESA comparativamente com o obtido com soro controlo. Verificou-se ainda que este efeito é maior dependendo da actividade da doença, pois verifica-se um aumento da expressão de TNF- $\alpha$  nos monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> na presença com soro de LESA comparativamente com soro LESI, embora sem significado estatístico. Este aumento na expressão de TNF- $\alpha$ , nos monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> poderá, em parte, ser explicado pela presença de auto-anticorpos, micropartículas e IC circulantes com a capacidade de activar os receptores Fc das IgG (Fc $\gamma$ R) e receptores tipo toll (TLRs) que conduzem ao aumento da produção deste tipo de citocinas.(60,61) Os Fc $\gamma$ R ligam-se à região Fc das IgG e são activados pela ligação cruzada que ocorre após a ligação de IgG

multimérica, como aquela presente nos IC ou agentes patogénicos opsonizados. A ligação de IgG a FcγR de células mieloides activam funções efectoras celulares, incluindo fagocitose de agentes patogénicos opsonizados, *clearance* endocítica de IC e produção de citocinas, quimiocinas e espécies reactivas de oxigénio intermédias.(62,63) O soro de doentes com LES tem níveis aumentados de micropartículas IgG positivas, sendo uma fonte de auto-antigénios imunogénicos para ligação a anticorpos circulantes, resultando na formação de IC.(64,65) Assim, a presença de IC pode, por si só, ser suficiente para iniciar uma resposta auto-imune com produção de citocinas.(66–68)

Em relação às mDCs do sangue periférico, não se observaram diferenças na expressão de TNF-α entre os diferentes soros, o que pode em parte ser explicado pelo facto de a maioria destas células serem imigrantes recentes da medula óssea, encontrando-se por isso no seu estado imaturo, e por essa razão menos sensível à inflamação mediada pelos soros dos doentes com LES.(69)

As diferenças observadas na expressão de TNF-α pelas diferentes células em estudo poderão em parte ser explicadas pela forma desigual de expressão dos receptores para Fc das IgG. Deste modo, os monócitos expressam de forma constitutiva o CD64 (FcγRI), receptor de alta afinidade, por outro lado, as DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> expressam CD16 (FcγRIII) e as mDCs expressam baixos níveis de CD32 (FcγRII), receptores de baixa e intermédia afinidade. (66) Estudos referem ainda que os níveis de expressão de FcγRI/CD64 em monócitos circulantes estão significativamente elevados em doentes com LES (26), podendo especular-se que estas alterações poderão dever-se, não apenas a defeitos intrínsecos à célula, mas estar relacionadas com os constituintes séricos. Está bem estabelecido que a captura de antigénios pelos receptores de superfície, como são exemplo os receptores para Fc das IgG, permitem o processamento de antigénios via receptor mediado por endocitose. No nosso estudo, verificámos ainda que os monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> apresentam uma maior expressão de receptores para Fc das IgG, quando comparados com mDCs e pDCs. Uma vez que os monócitos e as DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> exibem um padrão distinto de expressão de receptores Fc, o seu papel na fagocitose também é diferente. Deste modo, a presença de CD16 e ausência de CD64 nas células DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> sugere que estas células poderão desempenhar um papel importante quando a concentração antigénica é elevada, como se verifica no soro de doentes com LES, principalmente naqueles com doença activa(18,32,70)

Relativamente aos resultados obtidos no estudo da IL-6, não foram encontradas diferenças na expressão desta citocina em monócitos, mDCs e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> quando comparados os efeitos do soro de doentes com LESA, LESI e soro controlo. Estes resultados indicam que a expressão de IL-6 não é estimulada por constituintes séricos, nomeadamente pela internalização de IC via FcγR, sendo necessários estudos subsequentes para clarificar estes resultados.(71)

De modo a reforçar a importância dos IC, presentes no soro dos doentes com LES, na activação celular, procurou-se relacionar o título de Ac. anti-dsDNA com a expressão de citocinas pelas células em estudo. Em concordância com os resultados anteriores, apenas foi observada uma maior expressão de TNF-α por monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> em contacto com soro Alto Ac. anti-dsDNA quando comparada com o efeito produzido pelo soro Baixo Ac. anti-dsDNA e soro do grupo controlo. Resultados concordantes com os anteriores foram obtidos quando se estudou a influência do soro de doentes com nefrite lúpica e envolvimento cutâneo, verificando-se assim que o efeito produzido pelo soro de doentes com LES é proporcional à actividade da doença, aumentando a expressão de TNF-α por monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>.

Embora estudos adicionais sejam necessários para identificar a composição dos constituintes séricos que provocam as alterações observadas, está bem referenciado que o IFN-α é uma citocina chave na patogénese do LES. Estudos anteriores referem que os IC presentes no soro de doentes com LES contêm ácidos nucleicos que são internalizados via FcγRIIa, chegam ao endossoma e estimulam o TLR7 e/ou TLR9, levando a uma subsequente activação, transcrição de factores e produção de IFN-α, principalmente pelas pDCs(37,55) O IFN-α circulante induz à diferenciação de monócitos em DCs, que capturam de modo eficiente os corpos apoptóticos e nucleossomas que estão presentes no sangue de doentes com LES. A subsequente apresentação de auto-antígenios às células T CD4<sup>+</sup> pelas DCs leva ao início da expressão de células T auto-reactivas e células B produtoras de auto-anticorpos, que formam mais IC. A deposição de IC nos tecidos activa os monócitos/macrófagos e as DCs CD16<sup>+</sup> CD14<sup>-low</sup>, iniciando uma cascata inflamatória de citocinas e quimiocinas. A libertação destes mediadores pro-inflamatórios, como o TNF-α, culmina no dano celular, formação de novos IC e IFN-α. Deste modo, inúmeros estudos referem que doentes com LES exibem um maior nível sérico de IFN- α e que estes níveis estão correlacionados com a produção de anti-dsDNA e a actividade da doença,

apresentando uma maior expressão de genes indutores de IFN- $\alpha$ , sendo referenciada como “assinatura do IFN- $\alpha$ ”. (46,48,72–74) Embora alguns estudos *in vitro* sugiram uma regulação cruzada entre o IFN- $\alpha$  e o TNF- $\alpha$  (75), uma análise em larga escala dos níveis de TNF- $\alpha$  no LES (76) mostrou que os níveis das duas citocinas estão positivamente correlacionados e que o mesmo pode estar relacionado com a presença de IC. Estudos de Aringer *et al* demonstram haver uma sólida evidência da sobreexpressão de IFN- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  em muitos doentes com LES, evidenciando o papel de ambas as citocinas na patogénese do LES, como resultado do efeito produzido pelos IC no aumento da produção de citocinas, extensão da inflamação e dano tecidual ao longo do tempo. Salientam ainda que, em condições onde ambas as citocinas estão presentes em níveis baixos, cada uma ajuda no controlo da outra; no entanto, num estado de activação do sistema imune, como é o caso do produzido pelos IC no LES, a modulação recíproca é esquecida, verificando-se um aumento de ambas as citocinas.(77)

No sentido de esclarecer o efeito estimulatório do soro de doentes com LES, relacionado com a produção TNF- $\alpha$  por diversos subtipos celulares, foi avaliada a expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  em monócitos, mDCs, DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> e linfócitos T do sangue periférico, obtidos a partir de separação celular e após contacto com soro de doentes com LES, mas sem o estímulo com LPS. Apenas foi observada uma maior expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  nas DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> em contacto com soro de doentes com LES, quando comparado com o efeito do soro controlo ou amostras sem estímulo. Como esperado, não foram encontradas diferenças na expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  nos linfócitos T, uma vez que estes não apresentam receptores para Fc das IgG na sua membrana. Estes resultados demonstram mais uma vez a importância das DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup> na patofisiologia do LES. Evidências recentes sugerem que estas células são derivadas de tecidos, reentrando na circulação periférica, reflectindo na periferia o dano tecidual, encontrando-se já num estado de activação e expressando fortemente Fc $\gamma$ RIII CD16<sup>+</sup> que lhes permite responderem de forma mais eficiente a estímulos periféricos como os IC circulantes do que as restantes células (32,37,78–80)

Uma vez reconhecido o efeito estimulatório que o soro induz nos monócitos e principalmente nas DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-low</sup>, reflectido pela produção aumentada de TNF- $\alpha$  e maior expressão de mRNA de TNF- $\alpha$  nestas células, quantificou-se a concentração de TNF- $\alpha$  solúvel no soro de doentes com LES, em diferentes estádios, com diferentes

manifestações clínico-laboratoriais e diferentes terapêuticas. Como esperado, observou-se uma maior concentração sérica de TNF- $\alpha$  em doentes com LES, particularmente em doentes num estágio de doença activa e em doentes com alto título de ac. anti-dsDNA. Verificou-se que a concentração sérica desta citocina também está relacionada com as manifestações clínicas, como é o caso da nefrite lúpica. Estes resultados são coerentes com outros já descritos, que confirmam o aumento da concentração sérica de TNF- $\alpha$  nos doentes com LES, e que correlacionam estas concentrações com a actividade da doença.(25,81,82) Por outro lado, não foram encontradas diferenças nos doentes sujeitos a terapêutica com imunossuppressores, hidroxicloraquina ou esteróides, pelo que se pode especular que a terapêutica não parece influenciar os níveis séricos de TNF- $\alpha$ . (83)(84)

Estudos subsequentes serão necessários para determinar se o TNF- $\alpha$  produzido neste estado de doença é biologicamente activo. É possível que a produção de níveis aumentados de TNF- $\alpha$  seja contrabalançada pela produção aumentada de receptores de TNF- $\alpha$  ou citocinas antagonistas *in vivo*.(25)

A expressão aumentada de TNF- $\alpha$  por monócitos e principalmente por DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup>, quando na presença de soro de doentes com LES, associado ao aumento da concentração sérica de TNF- $\alpha$ , leva a considerar que a terapêutica anti-TNF- $\alpha$ , embora ainda controversa,(85–87) possa ser promissora.



## 6. Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo parecem evidenciar a capacidade dos constituintes séricos, nomeadamente imuno-complexos e/ou citocinas, de doentes com LES, em estimular, por si só, monócitos e DCs CD16<sup>+</sup>CD14<sup>-/low</sup> de indivíduos normais. A activação celular provocada pelos soros, particularmente os que possuem um título mais elevado de anticorpos anti-dsDNA leva a uma maior expressão de TNF- $\alpha$  produzido pelas células estudadas, o que de alguma forma, se parece traduzir por uma concentração aumentada de TNF- $\alpha$  sérico.

Este estudo enfatiza o papel dos mediadores solúveis na inflamação crónica observada no LES e descentraliza as atenções focadas apenas nos defeitos intrínsecos das células dos doentes com LES.

Um estudo mais alargado, com maior número de doentes com diferente actividade da doença, bem como uma melhor caracterização fenotípica das células em estudo, assim como dos constituintes séricos, poderá clarificar melhor o papel destes últimos na fisiopatologia do LES, bem como uma possível comparação com outras doenças auto-imunes

## 7. Bibliografia

1. Kotzin BL. Systemic Lupus Erythematosus. *Cell*. 1996;85:303–6.
2. Askanase A, Shum K, Mitnick H. Systemic lupus erythematosus: an overview. *Soc. Work Health Care*. 2012 Aug;51(7):576–86.
3. Agmon-Levin N, Mosca M, Petri M, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus one disease or many? *Autoimmun. Rev. Elsevier B.V.*; 2012 Jul;11(8):593–5.
4. De Zubiria Salgado A, Herrera-Diaz C. Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune Dis*. 2012 Jan;2012:1–21.
5. Smith PP, Gordon C. Systemic lupus erythematosus: clinical presentations. *Autoimmun. Rev. Elsevier B.V.*; 2010 Nov;10(1):43–5.
6. Griffiths B, Mosca M, Gordon C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. 2005 Oct;19(5):685–708.
7. Dhir V. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: Do they make the mark? *Indian J. Rheumatol. Indian Rheumatology Association*; 2012 Mar;7(1):13–20.
8. Sule S, Rosen A, Petri M, Akhter E, Andrade F. Abnormal production of pro- and anti-inflammatory cytokines by lupus monocytes in response to apoptotic cells. *PLoS One*. 2011 Jan;6(3):1–8.
9. Conti G, Coppo R, Amore A. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (LES). *G. Ital. Nefrol*. 2003;29 Suppl 5:S84–90.
10. Marks SD, Tullus K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Pediatr. Nephrol*. 2012 Oct;27(10):1855–68.
11. Mok C, Lau C. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol*. 2003;56:481–90.
12. Rekvig OP, Putterman C, Casu C, Gao H-X, Ghirardello A, Mortensen ES, et al. Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders? *Autoimmun. Rev. Elsevier B.V.*; 2012 Jul;11(8):596–603.
13. Gaipf US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Autoimmun*. 2007;28(2-3):114–21.
14. Craig M, Bankovich A. Clearance of anti-double-stranded DNA antibodies: The natural immune complex clearance mechanism. *Arthritis Rheum*. 2000;43(10):2265–75.
15. Walport MJ. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res*. 2002 Jan;4(3):279–93.

16. Papp K, Végh P, Hóbor R, Szittner Z, Vokó Z, Podani J, et al. Immune Complex Signatures of Patients with Active and Inactive SLE Revealed by Multiplex Protein Binding Analysis on Antigen Microarrays. *PLoS One*. 2012 Jan;7(9):1–10.
17. Li Y, Lee PY, Reeves WH. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 2010 Oct;58(5):355–64.
18. Henriques A, Inês L, Carvalheiro T, Couto M, Andrade A, Pedreiro S, et al. Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int*. 2012 Apr;32(4):863–9.
19. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J. Leukoc. Biol*. 2001 Jan;69(1):11–20.
20. Katsiari CG, Liossis S-NC, Sfikakis PP. The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. *Semin. Arthritis Rheum*. Elsevier Inc.; 2010 Jun;39(6):491–503.
21. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr. Opin. Immunol*. 2002;14:136–45.
22. Cepika A-M, Bendelja K, Vergles JM, Malenica B, Kapitanovic S, Gagro A. Monocyte response to LPS after exposure to corticosteroids and chloroquine with implications for systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol*. 2010 Nov;72(5):434–43.
23. Cruz-Machado S da S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição génica via fator de transcrição NFkB. *Rev. da Biol*. 2010;4:40–3.
24. Bzowska M, Lo S, Zembala M, Pryjma J. Peripheral Blood CD14 high CD16 + Monocytes are Main Producers of IL-10. *Scand. J. Immunol*. 2008;67:152–9.
25. Steinbach F, Henke F, Krause B, Thiele B, Burmester GR, Hiepe F. Monocytes from systemic lupus erythematosus patients are severely altered in phenotype and lineage flexibility. *Ann. Rheum. Dis*. 2000 Apr;59(4):283–8.
26. Li Y, Lee PY, Sobel ES, Narain S, Satoh M, Segal MS, et al. Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Res. Ther*. 2009 Jan;11(1):1–13.
27. Li Y, Lee PY, Kellner ES, Paulus M, Switanek J, Xu Y, et al. Monocyte surface expression of Fcγ receptor RI (CD64), a biomarker reflecting type-I interferon levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther*. 2010 Jan;12(3):1–12.
28. Yuan W, DiMartino SJ, Redecha PB, Ivashkiv LB, Salmon JE. Systemic lupus erythematosus monocytes are less responsive to interleukin-10 in the presence of immune complexes. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):212–8.
29. Ou J-N, Wiedeman AE, Stevens AM. TNF-α and TGF-β Counter-Regulate PD-L1 Expression on Monocytes in Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep*. 2012 Jan;2:1–8.

30. León B, López-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin. Immunol.* 2005;17:313–8.
31. Mohty M, Vialle-Castellano A. IFN- $\alpha$  skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J. Immunol.* 2003;171:3385–93.
32. Almeida J, Bueno C, Algueró MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin. Immunol.* 2001 Sep;100(3):325–38.
33. Morgado JM, Pratas R, Laranjeira P, Henriques A, Crespo I, Regateiro F, et al. The phenotypical and functional characteristics of cord blood monocytes and CD14(-/low)/CD16(+) dendritic cells can be relevant to the development of cellular immune responses after transplantation. *Transpl. Immunol.* 2008 Apr;19(1):55–63.
34. Pereira MI, Paiva A. Dendritic cells in cord blood transplantation: a review. *Stem Cells Int.* 2011 Jan;2011:1–7.
35. Bánki Z, Kacani L, Müllauer B, Obermoser G, Niederegger H, Schennach H, et al. Cross-Linking of CD32 Induces Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Via NF- $\kappa$  B Signaling Pathway. *J. Immunol.* 2013;170:3963–70.
36. Döbel T, Kunze A, Babatz J, Tränkner K, Ludwig A, Schmitz M, et al. Fc  $\gamma$  RIII ( CD16 ) equips immature 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells ( slanDCs ) with a unique capacity to handle IgG-complexed antigens. *Blood.* 2013;121(18):3609–18.
37. Carvalheiro T, Rodrigues A, Lopes A, Inês L, Velada I, Ribeiro A, et al. Tolerogenic versus Inflammatory Activity of Peripheral Blood Monocytes and Dendritic Cells Subpopulations in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* 2012 Jan;2012:1–14.
38. Crispín JC, Vargas-Rojas MI, Monsiváis-Urenda A, Alcocer-Varela J. Phenotype and function of dendritic cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Elsevier Inc.*; 2012 Apr;143(1):45–50.
39. Ding D, Mehta H, Mccune WJ, Kaplan MJ. Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in Systemic Lupus Erythematosus 1. *J. Immunol.* 2006;177:5878–89.
40. Crispin JC, Alcocer-Varela J. The role myeloid dendritic cells play in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 2007 Aug;6(7):450–6.
41. Fransen JH, van der Vlag J, Ruben J, Adema GJ, Berden JH, Hilbrands LB. The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2010 Jan;12(2):1–8.
42. Berger S. Immune complex-induced interleukin-6, interleukin-10 and prostaglandin secretion by human monocytes: a network of pro- and anti- inflammatory cytokines dependent on the antigen : antibody ratio. *Eur. J. Immunol.* 1996;26:1297–301.

43. García-García E, Rosales C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 2002 Dec;72(6):1092–108.
44. Connolly JJ, Hakonarson H. Role of cytokines in systemic lupus erythematosus: recent progress from GWAS and sequencing. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 Jan;2012:1–17.
45. Niewold TB, Clark DN, Salloum R, Poole BD. Interferon alpha in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 Jan;2010:948364.
46. Ohl K, Tenbrock K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 Jan;2011:1–14.
47. Blanco P, Palucka K, Gill M, Pascual V, Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Science.* 2001 Nov 16;294(5546):1540–3.
48. Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Delignat S, Mouthon L, Weill B, Kazatchkine MD, et al. Intravenous immunoglobulin abrogates dendritic cell differentiation induced by interferon- $\alpha$  present in serum from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003 Dec;48(12):3497–502.
49. Joo H, Coquery C, Xue Y, Gayet I, Dillon SR, Punaro M, et al. Serum from patients with SLE instructs monocytes to promote IgG and IgA plasmablast differentiation. *J. Exp. Med.* 2012 Jul 2;209(7):1335–48.
50. Bengtsson A, Sturfelt G. Induction of apoptosis in monocytes and lymphocytes by serum from patients with systemic lupus erythematosus - an additional mechanism to increased autoantigen load? *Clin. Exp. Immunol.* 2004;135:535–43.
51. Schuerwegh A, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS. Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1  $\beta$ , interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in monocytes. *Cytometry.* 2001 Jun 15;46(3):172–6.
52. Bueno C, Almeida J, Alguero MC, Sa ML, Vaquero JM. Flow Cytometric Analysis of Cytokine Production by Normal Human Peripheral Blood Dendritic Cells and Monocytes : Comparative Analysis of Different Stimuli , Secretion-Blocking Agents and Incubation Periods. *Cytometry.* 2001;46(58):33–40.
53. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002 Jun 18;3(7):1–12.
54. Aringer M, Günther C, Lee-Kirsch M. Innate immune processes in lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* Elsevier Inc.; 2013;147(3):216–22.
55. Means T, Latz E, Hayashi F. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* 2005;115(2):407–17.
56. Hrycek E, Franek A, Błaszczak E, Dworak J, Hrycek A. Serum levels of selected chemokines in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatol. Int.* 2012 Mar 30;10:1–5.

57. Jacob N, Stohl W. Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 2011;228(13):1–11.
58. Yat D, Yap HIN, Lai KARN. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus – from bench to bedside. *Nephrology.* 2013;18:243–55.
59. Yat D, Yap H, Lai KN. Cytokines and Their Roles in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus : From Basics to Recent Advances. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010;2010:1–10.
60. Kramer PR, Winger V, Reuben J. PI3K limits TNF- $\alpha$  production in CD16-activated monocytes. *Eur J Immunol.* 2009;39(2):561–70.
61. Nabatian AS, Bashir MM, Wysocka M, Sharma M, Werth VP. Tumor necrosis factor  $\alpha$  release in peripheral blood mononuclear cells of cutaneous lupus and dermatomyositis patients. *Arthritis Res. Ther.* 2012 Jan;14(1):1–11.
62. Ji J-D, Tassiulas I, Park-Min K-H, Aydin A, Mecklenbrauker I, Tarakhovsky A, et al. Inhibition of interleukin 10 signaling after Fc receptor ligation and during rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 2003 Jun 2;197(11):1573–83.
63. Zhou M, Li L, Peng H, Li R, Feng C. Decreased ITGAM and Fc $\gamma$ RIIIA mRNA expression levels in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Med.* 2013;1–6.
64. Nielsen C, Østergaard O. Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. *Arthritis ....* 2012;64(4):1227–36.
65. Nielsen C, Østergaard O. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis ....* 2011;63(10):3067–77.
66. Tanaka M, Krutzik SR, Sieling P a, Lee DJ, Rea TH, Modlin RL. Activation of Fc gamma RI on monocytes triggers differentiation into immature dendritic cells that induce autoreactive T cell responses. *J. Immunol.* 2009 Aug 15;183(4):2349–55.
67. Abrahams V, Cambridge G. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  production by adhered human monocytes: a key role for Fc $\gamma$  receptor type IIIa in rheumatoid arthritis. *Arthritis ....* 2000;43(3):608–16.
68. Karsten CM, Köhl J. The immunoglobulin , IgG Fc receptor and complement triangle in autoimmune diseases. *Immunobiology.* 2012;217:1067–79.
69. Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and “inflammatory” dendritic cells in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 2009;129(2):302–8.
70. Kopp E, Mende I, Hoffmann P, Wolf A, Lutterbu R, Baeuerle PA, et al. Highly efficient antigen targeting to M-DC8 1 dendritic cells via Fc c RIII / CD16-specific antibody conjugates. *Int. Immunol.* 2005;17(5):539–47.

71. Gilbert MR, Carnathan DG, Cogswell PC, Lin L, Baldwin AS, Vilen BJ. Dendritic Cells from Lupus-Prone Mice Are Defective in Repressing Immunoglobulin Defective in Repressing Immunoglobulin Secretion. *J. Immunol.* 2007;178:4803–10.
72. Rönnblom L, Alm G V. Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res. Ther.* 2003;5(2):68–75.
73. Obermoser G, Pascual V. The interferon- $\alpha$  signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010;19(9):1012–9.
74. Aricò E, Castiello L, Urbani F, Rizza P, Panelli MC, Wang E, et al. Concomitant detection of IFN  $\alpha$  signature and activated monocyte / dendritic cell precursors in the peripheral blood of IFN  $\alpha$  -treated subjects at early times after repeated local cytokine treatments. *J. Transl. Med. BioMed Central Ltd;* 2011;67(9):1–15.
75. Palucka AK, Blanck J-P, Bennett L, Pascual V, Banchereau J. Cross-regulation of TNF and IFN- $\alpha$  in autoimmune diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005 Mar 1;102(9):3372–7.
76. Weckerle CE, Mangale D, Franek BS, Kelly J a, Kumabe M, James J a, et al. Large-scale analysis of tumor necrosis factor  $\alpha$  levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Sep;64(9):2947–52.
77. Aringer M, Crow MK. A Bridge Between Interferon-  $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor in Lupus. *J. Rheumatol.* 2008;35(8):1473–6.
78. Baey A De, Mende I, Baretton G, Hartl WH, Baeuerle PA, Diepolder M. A Subset of Human Dendritic Cells in the T Cell Area of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue with a High Potential to Produce TNF-  $\alpha$ . *J. Immunol.* 2003;170:5089–94.
79. Hänsel A, Günther C, Baran W, Bidier M, Lorenz H, Schmitz M, et al. Human 6-sulfo LacNAc ( slan ) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *J. Autoimmun. Elsevier Ltd;* 2013;40:1–8.
80. Randolph G. The CD16+ (Fc $\gamma$ RIII+) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.* 2002;196(4):517–27.
81. Sullivan K, Suriano A, Dietzmann K. The TNF $\alpha$  locus is altered in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* 2007;123(1):74–81.
82. Rutella S, De Cristofaro R, Ferraccioli G. Function and dysfunction of dendritic cells in autoimmune rheumatic diseases. *Hum. Immunol. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics;* 2009 May;70(5):360–73.
83. Cooper DL, Martin SG, Robinson JI, Mackie SL, Charles CJ, Nam J, et al. Fc $\gamma$ RIIIa expression on monocytes in rheumatoid arthritis: role in immune-complex stimulated TNF production and non-response to methotrexate therapy. *PLoS One.* 2012 Jan;7(1):1–10.
84. Sacre K, Criswell L a, McCune JM. Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon- $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by plasmacytoid dendritic cells

- in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* BioMed Central Ltd; 2012 Jan;14(3):R155.
85. Zhu L-J, Yang X, Yu X-Q. Anti-TNF-alpha therapies in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 Jan;2010:1–8.
  86. Bethunaickan R, Sahu R, Liu Z, Tang YT, Huang W, Edegbe O, et al. Anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment of interferon- $\alpha$ -induced murine lupus nephritis reduces the renal macrophage response but does not alter glomerular immune complex formation. *Arthritis Rheum.* 2012 Oct;64(10):3399–408.
  87. Kiss L, Lovasz B, Golovics P, Vegh Z. Levels of Anti-Double-Strained DNA but not Antinuclear Antibodies are Associated with Treatment Efficacy and Adverse Outcomes in Crohn's Disease Patients Treated with anti-TNF-alpha. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2013;22(2):135–40.